



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS

DEPARTAMENTO DE FÍSICA

Tesis presentada para optar al grado de Doctor de la Facultad de Ciencias Exactas

MICROSCOPIA HOLOGRAFICA DIGITAL

Aplicaciones a la caracterización de microorganismos

Andrea Carolina Monaldi

Director: Dra. Gladis Graciela Romero

Co-Director: Dra. Liliana Moraña

Asesor: Dr. Néstor Bolognini

Año 2015

*“Ver lo que está delante de nuestros ojos
requiere de un esfuerzo constante”
G. Orwell*

A mis padres, Marita y Rubén

A Atilio

A la memoria de mi abuelo Dorino

Agradecimientos

«Together we stand, divided we fall» (Pink Floyd)

Creo firmemente que cualquier logro «personal», nunca es tal, sino producto de la colaboración, generosidad y apoyo explícito e implícito de muchas personas. Todos aquellos que me han rodeado en estos años me han inspirado y enseñado muchísimo.

Quiero agradecer especialmente a la Dra. Graciela Romero, mi directora, quién no sólo ha depositado su confianza en la realización de esta tesis, alentando mi crecimiento profesional, sino que también ha sido constantemente un ejemplo de trabajo, perseverancia, pasión y optimismo. Mi gratitud infinita hacia ella por sus consejos, sus conocimientos, experiencia, mirada crítica y, sobre todo, por su apoyo maternal y haberme brindado su amistad.

Agradezco a mi co-directora, la Dra. Liliana Moraña, por su cálida predisposición para atender mis consultas y valiosa colaboración y sugerencias brindadas en el desarrollo de este trabajo.

A Elvio Alanís, quien durante estos años ha sido un ejemplo, un maestro, y ha contribuido inestimablemente en mi formación profesional con sus consejos, sabiduría y su mano generosa. También a todos los integrantes del Grupo de Óptica Láser por su compañerismo y apoyo: Gustavo Curkovic, Dante Domínguez, y especialmente a Daniel Vitulli y Facundo Flores por confiar en mí.

Le estoy inmensamente agradecida al Dr. Néstor Bolognini, que ha sido un referente de la excelencia. Su invaluable ayuda, predisposición, sus respuestas justas y claras, y el estímulo brindado durante estos años me honran en el placer de haberlo conocido.

A Carlitos Cabrera, por depositar en mí su confianza para la dirección de su Trabajo Final, en cuyo proceso descubrí una persona con una inteligencia excepcional y de gran generosidad. Le agradezco enormemente por esas charlas interminables “dibujando” ideas, investigando, y erigiendo en recreos y meriendas una franca amistad.

A mis compañeros de cátedra de Física 1 por su valioso respaldo: Víctor Passamai, Héctor Suárez, Rosalba Panza y Patricia Villagra. A todos mis alumnos y a todas las personas que conforman el Departamento de Física de la Universidad Nacional de Salta y el INENCO. Todos ellos me han brindado su refrescante calidez durante el transcurso de este camino.

Mi gratitud a todas las entidades académico-científicas: Universidad Nacional de La Plata, Universidad Nacional de Salta, CONICET, CIUNSa, y a mi país.

A mis afectos: mi familia y mis amigos. Desde siempre mi pilar. Quizá la mayor fuente de inspiración ha sido su honesto y tierno amor. A Atilio, mi amor, y mi compañero de ruta, sostén con sus brazos en cada caída y frustración, y mi cómplice en esta vida regalándome felicidad cada día. A mis «viejos», Marita y Rubén, a quienes admiro profundamente; ellos han sido mi guía y los «co-autores» de cada logro al haberme brindado tanto amor. A mi hermano Franco, mi sinónimo de ternura, mi incondicional amigo. A mi sobrino, Mateo, por iluminarme con su mirada. A mi abuela Olga, por «detener el tiempo» con sus historias. A Verónica Monteros, Romina Rojas y Lorena Guinart con quienes siempre

puedo contar. A todos mis amigos y amigas, especialmente a mis amigas de la infancia con quienes sigo creciendo, riendo ... soñando.

Índice general

Resumen	1
1. Introducción General	3
1.1. Motivación e Hipótesis de Investigación	3
1.2. Objetivos	5
1.3. Microscopía Holográfica Digital	6
1.4. Aplicaciones a la caracterización de microorganismos	9
1.4.1. Cuantificación de biovolumen de microalgas	9
1.4.2. Identificación automática de especímenes	10
1.5. Organización de la Tesis	11
2. Fundamentos Teóricos I	15
2.1. Perturbación Óptica y Amplitud Compleja	16
2.1.1. La onda plana	17
2.1.2. La onda esférica - Aproximación de Fresnel	19
2.1.3. La fase como portadora de información	20
2.2. Sistemas Lineales	21
2.2.1. Integral de superposición - Respuesta Impulsiva	22
2.2.2. Sistemas Lineales Invariantes - Función de Transferencia	23
2.3. Difracción	24
2.3.1. Resultados de la teoría de Kirchhoff	25
2.3.2. Propagación del Espectro Angular	30
3. Fundamentos Teóricos II	35
3.1. Holografía convencional	37
3.1.1. Proceso de Registro	37
3.1.2. Proceso de reconstrucción	39
3.1.3. Tipos de hologramas	40
3.2. Holografía Digital	43
3.2.1. Consideraciones para el registro en HD	44
3.2.2. Proceso de reconstrucción numérica	46
3.3. Microscopía Holográfica Digital	50
3.3.1. Configuraciones experimentales	50
3.3.2. Consideraciones para la reconstrucción	54
4. Implementación de la MHD	57
4.1. Montaje experimental	57

4.2.	Experiencias preliminares	59
4.2.1.	Registro de los hologramas	60
4.2.2.	Reconstrucción de los hologramas	61
4.2.3.	Medición de las distancias de reconstrucción	68
4.2.4.	Enfoque numérico	69
4.2.5.	Tamaño de los campos de reconstrucción	70
4.2.6.	Determinación del ángulo entre el haz objeto y el haz de referencia	71
4.2.7.	Comparación de métodos de reconstrucción	75
5.	Análisis de mapas de fase bidimensionales	79
5.1.	Análisis de la fase	80
5.2.	La fase en Interferometría	82
5.3.	Desenvolvimiento de fase	83
5.3.1.	Método de desenvolvimiento de fase por cuadrados mínimos	83
5.3.2.	Desenvolvimiento mediante Mapas de Calidad	90
5.3.3.	Filtro de la mediana para disminución de ruido	95
5.4.	Método con dos longitudes de onda	96
5.4.1.	Introducción	97
5.4.2.	Propuesta para la reducción de ruido	98
5.4.3.	Obtención de mapas diferenciales de fase sintéticos en Microscopía Holográfica Digital, utilizando dos longitudes de onda	100
5.5.	Conclusiones	103
6.	Procesamiento de los hologramas	105
6.1.	Implementación del método PEA en lenguaje Python	105
6.2.	Pre-procesamiento del holograma	108
6.2.1.	Normalización	109
6.2.2.	Apodización numérica	109
6.2.3.	Atenuación del orden cero	110
6.3.	Tratamiento del espectro	112
6.3.1.	Identificación automática de los órdenes	114
6.3.2.	Criterio de selección para el tamaño de la máscara	115
6.3.3.	Creación de máscaras	116
6.4.	Implementación de un mecanismo de autofocus	121
6.5.	Segmentación de imágenes	123
6.5.1.	Segmentación por similitud o umbralización	124
6.5.2.	Segmentación por detección de bordes	128
6.5.3.	Discusión	132
7.	Métodos para la corrección de Aberraciones	133
7.1.	Aberración por la geometría fuera de eje	133
7.1.1.	Determinación automática de la inclinación del haz de referencia	134
7.1.2.	Centrado del orden a reconstruir	135

7.2.	Método automático para la corrección de la aberración esférica en la fase	137
7.2.1.	Introducción	137
7.2.2.	Principios	140
7.2.3.	Resultados y Discusión	143
7.3.	Corrección del efecto <i>rolling shutter</i> producido por CMOS	146
7.3.1.	Introducción	147
7.3.2.	Efecto <i>rolling shutter</i> , eliminación y/o corrección	148
7.3.3.	Resultados y Discusión	151
7.3.4.	Conclusiones	154
8.	Detección de <i>Trypanosoma Cruzi</i> en sangre mediante MHD	155
8.1.	Introducción	155
8.2.	Enfermedad de Chagas	156
8.3.	Materiales y métodos	159
8.3.1.	Preparación de la muestra	160
8.3.2.	Registro y reconstrucción de los Hologramas	160
8.4.	Resultados y Discusión	160
8.5.	Conclusiones	163
9.	MHD aplicada a la evaluación de biovolumen microalgal	165
9.1.	Introducción	166
9.1.1.	Problemática regional	166
9.1.2.	<i>Ceratium hirundinella</i>	168
9.2.	Materiales y Métodos	169
9.2.1.	Registro de los hologramas y reconstrucción	169
9.2.2.	Estimación de biovolumen	170
9.3.	Resultados y Discusión	176
9.4.	Conclusiones	179
10.	Aplicaciones a la identificación de microalgas	181
10.1.	Introducción	181
10.2.	Materiales y métodos	183
10.2.1.	Transformada de Fourier-Mellin	183
10.2.2.	Problemas de la TFM discreta	190
10.3.	Implementación del descriptor invariante	191
10.3.1.	Clasificador automático: Primeros ensayos	191
10.3.2.	Nuevo clasificador automático	196
10.3.3.	Nuevas métricas de detección automática	198
10.3.4.	Discusión	202
10.4.	Aplicación a la identificación de microalgas	202
11.	Discusión General	209

A. Análisis de Fourier	213
A.1. Condiciones de definición y existencia	213
A.2. Teoremas	214
A.2.1. Teorema de Linealidad	214
A.2.2. Teorema de Similaridad	214
A.2.3. Teorema de Corrimiento	214
A.2.4. Teorema de Parseval	215
A.2.5. Convolución	215
A.3. Funciones Separables	215
B. Publicaciones	217
B.1. Revistas con Referato	217
B.1.1. En revisión	217
B.2. Presentaciones a Congresos	217
Bibliografía	219

Resumen

La Microscopía Holográfica Digital (MHD) ha demostrado ser una herramienta de gran utilidad para el estudio y caracterización de microestructuras y especímenes biológicos, dado que permite acceder a información cuali-cuantitativa del frente de onda transmitido o reflejado por ellos. La amplitud compleja de la luz emanada por el objeto queda registrada, a través de un arreglo interferométrico, en un medio fotosensible, que en el caso de la MHD es un sensor CCD (Charge Coupled Device) o CMOS (Complementary metal-oxide-semiconductor). A su vez, dicha información se recupera numéricamente haciendo uso de la Teoría Escalar de la Difracción. La MHD, por tanto, le ofrece a la Microscopía las notables bondades de la holografía digital, almacenando en un sólo holograma información «dual» del frente de onda: la amplitud y la fase, siendo esta última portadora de valiosa información del espécimen. En la configuración por reflexión la fase alberga la información superficial del objeto, mientras que en la configuración por transmisión la relacionada con su estructura interna, permitiendo la «visualización» y estudio de objetos transparentes, como lo son la mayoría de los especímenes biológicos.

Esta tesis abarca diversos aspectos de la MHD para el estudio y caracterización de objetos transparentes, cuyo resultado es el desarrollo de un prototipo experimental de Microscopio Holográfico Digital por transmisión, y la propuesta de numerosos algoritmos orientados al procesamiento numérico de los hologramas, con el fin de automatizar gran parte del proceso de reconstrucción y permitir la corrección automática de aberraciones de fase.

Adicionalmente, las aplicaciones desarrolladas se encuentran dirigidas a la caracterización de microorganismos de interés regional, bifurcadas en dos líneas principales. La primera involucra la propuesta de un método de detección de *Trypanosoma cruzi*, parásito causante de la enfermedad de Chagas. La segunda, el análisis cuali-cuantitativo de microalgas, enfocándose en la especie *Ceratium hirundinella*, responsable en los últimos años de recurrentes floraciones en los embalses del NOA, con consecuencias tales como tasas elevadas de mortandad de peces y modificación de la estructura del ecosistema acuático, entre otras de índole económica y ecológica. En este aspecto, se propone una metodología basada en MHD para el cómputo de biovolumen, un descriptor morfométrico de gran relevancia en los estudios de calidad de aguas para evaluar abundancia relativa, como biomasa y carbono. Paralelamente, se propone un descriptor invariante a traslaciones rotaciones y cambios de escala como herramienta que podría ser de utilidad para la identificación automática de la especie.

1. Introducción General

«Research is what I'm doing when I don't know what I'm doing.» («Investigación es lo que estoy haciendo cuando no sé lo que estoy haciendo»)
- Wernher von Braun

1.1. Motivación e Hipótesis de Investigación

Usualmente, muchos especímenes biológicos y microorganismos (parásitos, bacterias, microalgas, etc.) son transparentes, por lo que exhiben muy bajo contraste en amplitud y resulta difícil distinguirlos de sus alrededores mediante microscopía convencional. Especímenes de este tipo se clasifican como *objetos de fase*, ya que cuando una onda de luz los atraviesa, su fase se altera y su amplitud no. Sin embargo, dado que todos los sensores fotosensibles (tales como películas fotográficas, sensores electrónicos digitales, e incluso la retina) responden sólo a variaciones de amplitud, el problema debe abordarse a partir de técnicas alternativas, que mejoren la visibilidad de estos especímenes sin alterarlos química o físicamente (por ejemplo mediante tinciones) [Goo68, Hec87].

En este sentido, la microscopía de contraste de fase de Zernike, la de Nomarski y la de campo oscuro son técnicas que constituyen herramientas invaluable para el estudio detallado de células vivas y microorganismos, e incluso para la comprensión de procesos celulares. Pese a no ser idóneas para registrar medidas cuantitativas directas de la fase, cumplen un importante papel en Biología moderna y Medicina. El acceso a la información de fase es de especial interés ya que está directamente relacionada con las propiedades físicas del microorganismo. Podemos decir que una onda de luz “ve” un espécimen transparente a partir de la modificación de su fase.

La microscopía de contraste de fase para objetos biológicos puede abordarse también por medio de la Microscopía Holográfica Digital (MHD), que ha surgido en los últimos años como una técnica muy eficaz para el estudio y caracterización de microestructuras [CMD99, JT00, PRP⁺05, MJ05, MYLK05, MRM⁺05, MYK06]. La MHD tiene numerosas características que la hacen una alternativa interesante a la microscopía convencional; una de las más importantes es que, a diferencia de otras técnicas, ofrece acceso a información cualitativa y cuantitativa tanto de amplitud como de fase. Esto es así porque la holografía en general provee una imagen de campo completo de la muestra, permitiendo la reconstrucción de los mapas de índice de refracción, espesor de la muestra, perfil de la superficie, etc.

[JST01, GFDN⁺01, KCK⁺04, RMC⁺05, HMGC07]. La holografía llevada al dominio de la microscopía brinda así una herramienta única de especial valor para la caracterización de objetos microscópicos, compitiendo de manera ventajosa con las técnicas convencionales de microscopía óptica.

Un microscopio para holografía digital es esencialmente un microscopio convencional con una configuración óptica modificada, que usa un láser como fuente de luz, y que añade al microscopio unos pocos elementos ópticos para configurar un pequeño interferómetro de Mach Zehnder. Su sistema de imagen captura y almacena un holograma que se reconstruye numéricamente por computadora para recuperar la información completa del objeto.

Esta tesis surge en el marco de una colaboración interdisciplinaria entre el Laboratorio del Grupo de Óptica Láser (de ahora en más, GOL), el Laboratorio de Calidad de Aguas (en adelante, LCA), y el Laboratorio del Instituto de Patología Experimental (IPE, en lo sucesivo), todos pertenecientes a la Universidad Nacional de Salta.

El IPE se aboca a la investigación en enfermedades endémicas tropicales; en particular, la enfermedad de Chagas-Mazza se encuentra entre sus líneas de investigación más importantes. La efectividad de nuevas drogas para el ataque del parásito etiológico *Trypanosoma cruzi*, requiere del conteo de parasitemia por parte de técnicos y personal del Instituto, tarea que insume notable cantidad de tiempo, y que se ve dificultada por ser el parásito de muy bajo contraste óptico frente a los glóbulos rojos circundantes.

Por su parte, las metodologías de diagnóstico o relevamiento de información y análisis para las investigaciones que se llevan a cabo en el LCA comprenden el monitoreo continuo de organismos microscópicos (algas) de los ecosistemas de distintos embalses y ríos del NOA. Esto supone el recuento de individuos de las diferentes especies de microalgas y el cálculo de sus biovolúmenes para evaluar su abundancia relativa (como biomasa o carbono). Generalmente, estas observaciones son realizadas al microscopio con técnicas estandarizadas y demandan del concurso de especialistas o de técnicos altamente especializados. Muchas veces, la morfología de estos microorganismos es compleja y el rendimiento del análisis depende fuertemente de la correcta identificación y cuantificación, una tarea que no sólo es ardua, sino que insume gran cantidad de tiempo. En particular, en los últimos años la especie *Ceratium hirundinella* ha cobrado notable interés regional, pues ha sido responsable de recurrentes floraciones en los embalses del NOA, cuyas consecuencias incluyeron tasas elevadas de mortandad de peces y modificación de la estructura del ecosistema acuático, entre otras de índole económica y ecológica.

Surge así la necesidad de lograr que los trabajos de identificación de los microorganismos, u otro tipo de investigaciones en los que se utilice el microscopio, se lleven a cabo con la mayor rapidez y precisión posibles (alta especificidad y sensibilidad).

De acuerdo con estas consideraciones, el desarrollo de esta tesis tiene por finalidad implementar, por primera vez en el Laboratorio del GOL y según nuestro conocimiento por primera vez en Argentina, la MHD para el desarrollo de un microscopio

que combine observaciones en tiempo real, no invasivas y de alta resolución. El desarrollo persigue proveer de una herramienta versátil para el análisis de especímenes biológicos y microestructuras en general, y de microorganismos en particular. La hipótesis de base es que la puesta a punto de la MHD, junto con técnicas de procesamiento digital de imágenes permitiría la caracterización de los microorganismos citados (*T. cruzi* y *C. hirundinella*) a partir de la valiosa información cuantitativa de fase provista por la técnica, con posibilidades de competir favorablemente con los métodos que actualmente se emplean con estos fines.

Simultáneamente, los métodos y algoritmos aquí desarrollados podrían ser extrapolables para la caracterización e identificación de otro tipo de especímenes transparentes u opacos, y como herramientas de análisis y diagnóstico.

1.2. Objetivos

General:

Desarrollo y puesta a punto de un microscopio holográfico digital por transmisión para el estudio y caracterización de especímenes biológicos y microestructuras.

Específicos:

Desarrollo de nuevas técnicas y sistemas ópticos alternativos y/o complementarios del análisis cuali-cuantitativo de microorganismos, para evaluar:

- En el caso de las microalgas,
 1. Su estructura cuantitativa (biovolumen). Para ello, se propone la puesta a punto y calibración del microscopio holográfico digital, con el fin de abordar el registro de imágenes holográficas de especies de microalgas de importancia en la región (*Ceratium hirundinella*). Con el acceso cuantitativo a la fase es posible la determinación del biovolumen, siempre que se conozca el índice de refracción promedio del espécimen.
 2. Su estructura cualitativa (identificación). A partir de los hologramas reconstruidos mediante MHD, se propone el desarrollo y ensayo de sistemas de identificación basado en técnicas de procesamiento digital de imágenes (PDI). Los algoritmos de clasificación automática de especies deben ser robustos ante cambios de escala, traslaciones y/o rotaciones de los especímenes.
- En el caso del *Trypanosoma cruzi*,
 1. Su detección: mediante la comparación de hologramas del microorganismo en diferentes instantes de tiempo. La notable movilidad del parásito

facilita en cierta medida su detección visual; sin embargo, al mismo tiempo, induce variaciones en la fase del holograma, por lo que su detección puede realizarse al comparar hologramas decorrelacionados en las zonas en las que se encuentra el parásito.

Esta tesis, por tanto, está basada en el desarrollo e implementación de la MHD desde un punto de vista general, y en la puesta a punto de la técnica para la caracterización de microalgas y *T. cruzi* en particular. Éstos constituyen los principales ejes temáticos, y en base a ellos se estructura el presente manuscrito. En las siguientes secciones se describen brevemente los aspectos más importantes y básicos de la MHD y de las técnicas para caracterización de microorganismos; se mencionan algunos trabajos relacionados, y se expone brevemente el estado del arte de estas técnicas. Finalmente se presenta la estructura de la tesis con un breve detalle del contenido de cada capítulo.

1.3. Microscopía Holográfica Digital

Siempre que un objeto es iluminado con una fuente de luz coherente, la onda reflejada o transmitida lleva información de las propiedades ópticas y físicas de la muestra. En los alrededores del objeto, la intensidad de la luz queda relacionada con su reflectancia o atenuación, mientras que la fase con su topografía o espesor, esto es, con su información tridimensional. Los sensores de luz, tales como películas fotográficas o sensores electrónicos digitales, pueden usarse para medir la intensidad de la luz que emana el objeto, pero son incapaces de captar la fase. Esta información crucial, por tanto, se pierde. Desde un punto de vista matemático, este tipo de medida es equivalente a evaluar el módulo cuadrado de un número complejo, una operación que claramente descarta la fase.

Cuando Gabor propuso, en 1949, “un nuevo método en dos etapas para registrar una imagen”, su propósito era mejorar la resolución de los microscopios electrónicos [Gab48, Gab51]. Gabor dejó sentadas las bases teóricas que permiten registrar en una imagen bidimensional la información tridimensional de un objeto; esto es, amplitud y fase. Esta técnica fue bautizada con el nombre de holografía, del griego holos que significa ‘todo’ y graphein que significa ‘escribir’. Los requerimientos de coherencia para la fuente de luz que ilumina el objeto, demoraron el desarrollo de la holografía. A principios de la década del 60, con el advenimiento del láser, una fuente altamente coherente, la holografía se convirtió en una poderosa herramienta práctica no destructiva con vastos campos de aplicación en metrología óptica e ingeniería, medición de microdeformaciones, campos de desplazamiento, campos de temperatura, campos de velocidades, vibraciones, topografía y hasta incluso en arte [C.79]. En el año 1971 Dennis Gabor fue galardonado con el premio Nobel en Física «por la invención el desarrollo del método holográfico». En la actualidad, la holografía se ha convertido en una de las herramientas más utilizadas en la óptica moderna.

La esencia de la holografía, en lo que hace a los aspectos prácticos, puede resumirse en dos etapas:

1. El registro de la información del objeto (a partir de la amplitud y fase de la onda reflejada o transmitida), de un modo y sobre algún medio fotosensible adecuados.
2. La reconstrucción de la onda objeto original (amplitud y fase) a partir de la información almacenada durante la primera etapa, con conocimiento previo de las condiciones de registro.

La etapa de registro exige que la información de fase deba convertirse en variaciones de intensidad. Este fin se alcanza mediante un sistema interferométrico. El proceso consiste en registrar en un soporte adecuado la interferencia entre dos ondas coherentes: una onda objeto, que lleva la información de interés y una onda de referencia, de la cual se conocen sus características (amplitud y fase). En holografía clásica el medio de registro usualmente es alguna emulsión fotográfica depositada en una placa de vidrio o acetato.

La reconstrucción del holograma se logra iluminando la transparencia revelada con una onda coherente, réplica de la onda de referencia con la que se construyó el holograma. En esta instancia, la transparencia se comporta como una red difractante, de modo que la luz que la atraviesa se difracta y eventualmente reconstruye el objeto original. Un observador, mirando a través de la placa, ve una imagen virtual, que es indistinguible del objeto original, y que se encuentra a la misma distancia de la transparencia que el objeto original. La imagen reconstruida exhibe todos los efectos de perspectiva y profundidad de foco. Si el observador cambia de posición de observación, observa otra perspectiva del objeto, tal como ocurre con un objeto verdadero.

Desde 1990, con la invención de los dispositivos CCD (Charge Coupled Device) y actualmente los CMOS (complementary metal-oxide semiconductor), fue posible reemplazar el soporte de registro por el sensor de una cámara digital y sentar las bases para la Holografía Digital (HD) [Sch94, CBD99, JST01, LBU04, SJ05] . En este caso, la reconstrucción ya no es física sino numérica y emula el proceso físico que realiza la onda de referencia en holografía convencional. Con este fin, se debe recurrir a los fundamentos de la Teoría Escalar de la Difracción. Como resultado del proceso, se recupera el frente de onda objeto y la información del mismo puede desacoplarse como dos imágenes: una imagen de amplitud y una imagen de contraste de fase.

La implementación de esta técnica en microscopía se llama Microscopía Holográfica Digital (MHD). Su desarrollo es reciente y promete significativos avances en investigación celular, en medicina y biología. Los primeros reportes de trabajos de investigación en el campo de la MHD datan del año 1999. Particularmente, Cuhe *et al.* [CMD99] diseñaron la primera configuración para investigaciones en microscopía con la misma resolución transversal que en microscopía óptica. Al instrumento utili-

zado para la implementación de la técnica lo denominaron Microscopio Holográfico Digital.

La configuración experimental para MHD consiste en un interferómetro Mach-Zehnder modificado. El haz objeto del interferómetro recorre el tren óptico normal del microscopio e ilumina la muestra biológica. La luz dispersada por la misma atraviesa un Objetivo de Microscopio (OM) que forma una imagen real, aumentada e invertida de la muestra. A la salida del microscopio-interferométrico el haz objeto, que va a formar la imagen, interfiere con un haz de referencia en el sensor de una cámara digital (CCD o CMOS), y forma un holograma que por lo general no coincide con el plano imagen del objetivo. Generalmente, el haz de referencia llega al sensor con un pequeño ángulo con respecto a la dirección de propagación de la onda objeto. Esta configuración se conoce como holograma fuera de eje (off-axis hologram) y es útil para separar las imágenes conjugadas [Goo68]. Usualmente el plano del holograma (esto es, el plano del sensor) se ubica entre el OM y el plano imagen, a una distancia d de la imagen. Esta situación puede considerarse equivalente a una configuración holográfica sin lente con una onda objeto emergiendo directamente de la imagen aumentada y no del objeto en sí mismo. En otras palabras, en el sensor se registra la interferencia entre la onda de referencia y la onda que se dirige a formar la imagen real. La instancia de reconstrucción es idéntica a la empleada en holografía digital. Para ello, el frente de onda debe propagarse numéricamente la distancia d ; esto es, desde el plano del holograma hasta al plano donde se formó la imagen del espécimen.

Las imágenes de contraste de amplitud y de contraste de fase emergen del proceso de reconstrucción. No obstante, para que la información obtenida sea una representación verosímil del objeto bajo estudio (microorganismos), se precisa del análisis crítico de diversos aspectos relacionados con el montaje experimental, el proceso de reconstrucción y con el procesamiento digital de los hologramas. Por un lado, se requiere del ajuste preciso de varios parámetros, restricción que supone ya sea el conocimiento previo de los mismos, o bien el diseño de métodos computacionales para su cálculo automático. Adicionalmente, dado que los sistemas ópticos empleados introducen aberraciones de fase de diversa índole, estas deben corregirse ya sea física o numéricamente. Diversos trabajos han profundizado en la descripción de métodos y algoritmos desarrollados con estos propósitos [CMD99, CMK⁺06, CCC⁺06, CKC⁺06, DZS⁺09a, CWW⁺11]; éstos deberán estudiarse en función de los objetivos que esta tesis persigue.

Por otro lado, si bien en holografía convencional la fase surge naturalmente del proceso de reconstrucción del holograma, esto no ocurre en holografía digital. Más aún, el proceso numérico de reconstrucción sólo devuelve la versión envuelta de la fase real del frente de onda. Así, la estimación de la fase continua reviste crucial importancia para poder extraer la información física de interés. Para nuestros propósitos esta será un mapa de índices de refracción del microorganismo bajo estudio y/o su biovolumen. No obstante, en cualquier caso, la fase llevará la información más relevante y deberá estimarse mediante algún método de desenvolvimiento de fase. El problema de desenvolvimiento de fase no es trivial, por lo que en la literatura

abundan algoritmos que buscan lograr este cometido con mayor o menor éxito según el tipo de señal de la cual surja la fase envuelta [GR94, PG98]. Esto es, si bien existe una amplia gama de algoritmos de desenvolvimiento de fase, todos cuentan con ventajas y desventajas que deben evaluarse al momento de elegir el método adecuado para aplicar en cada caso particular. Básicamente, estos pueden categorizarse en dos clases: métodos locales de desenvolvimiento, tales como los métodos camino-dependientes y métodos globales, tales como los métodos de desenvolvimiento por cuadrados mínimos.

Previa a la realización de este trabajo, en las investigaciones que se llevan a cabo en el GOL no se habían aplicado métodos de desenvolvimiento de fase bidimensionales. El estudio e implementación de algoritmos de desenvolvimiento bidimensionales constituye uno de los objetivos de este trabajo, y uno de suma relevancia, pues sin un método robusto no es posible la determinación del biovolumen y la identificación automática de especímenes se torna más difícil.

Se intentará, entonces, conforme avance el proceso de estudio, calibración e implementación de la MHD lograr la mayor versatilidad posible en los procesos de construcción y reconstrucción de hologramas y en la obtención de mapas de fase continua, libre de aberraciones, todo de acuerdo a los objetivos generales y específicos planteados.

1.4. Aplicaciones a la caracterización de microorganismos

1.4.1. Cuantificación de biovolumen de microalgas

El biovolumen de las algas es el enfoque de numerosos trabajos debido a su significado fisiológico y ecológico [Rey84, VRT⁺92, HRK⁺99], por cuanto existen diversos métodos para su estimación. El conteo electrónico de partículas, la citometría de flujo y las técnicas de tomografía, por nombrar algunos, aunque útiles, no se aplican en las mediciones de rutina. En general requieren equipamientos costosos y además tienen ciertos inconvenientes que los hacen inapropiados para muchas áreas de investigación. Por ejemplo, la resolución taxonómica con citometría de flujo está limitada al nivel de grupos fácilmente discernibles, lo cual impide la distinción de especies o géneros que a menudo se requiere para estudios ecológicos. Por su parte, los resultados de contadores de células son erróneos cuando se trata de medir biovolumen de partículas no esféricas, como lo son la mayoría.

Mediante el cálculo del biovolumen microalgal se accede a la abundancia relativa como biomasa o carbono. En el caso particular del carbono, el cómputo de biovolumen de fitoplancton o conteo celular convertido a unidades de carbono se utiliza para estudios de flujo de materia orgánica en comunidades acuáticas. Calcular el carbono fitoplanctónico a partir del biovolumen, en lugar de hacerlo a partir de partículas

orgánicas de carbono elimina errores debido a las partículas detríticas que contienen usualmente las partículas orgánicas de carbono.

En el caso de la estimación de biomasa, ésta resulta esencial por diversos motivos. Es útil para comparar la contribución relativa de microalgas diferentes en muestras multiespecíficas, o entre muestras y sistemas. En general, para una muestra extraída de un cuerpo de agua, los tamaños involucrados varían en varios órdenes de magnitud, desde especies de menos de un micrón a las diatomeas que miden más de un milímetro de diámetro. En muestras multiespecíficas, un elevado número de especies de pequeño tamaño contribuyen sólo en una pequeña fracción a la biomasa total, mientras que especies de mayor tamaño, que en número son mucho menos abundantes, pueden dominar la contribución a la biomasa total. Por ende, el conteo celular *per se* resulta inadecuado como medida de la biomasa relativa algal. Otros parámetros convencionales relacionados con la medida de biomasa, tales como *clorofila a*, ATP, o partículas de carbono orgánico, varían dramáticamente según condiciones medioambientales, tales como la disponibilidad de luz y nutrientes.

El método más tradicional para estimar biomasa para microalgas es a partir de su biovolumen, el cual se calcula de manera aproximada a partir de la medición de ciertas dimensiones lineales accesibles al microscopio. Se han hecho pocos intentos para estandarizar el cálculo del biovolumen, con la búsqueda de modelos geométricos o formas que sean lo más similares posibles a la forma real del organismo [Rey84, Sma78, Edl79, KL66, HRK⁺99, SL03, VCB07]. La elección de formas geométricas equivalentes no es una tarea simple, y menos aún para microalgas de formas complejas tales como diatomeas o dinoflagelados, como es el caso de la microalga *Ceratium hirundinella*. Algunos modelos son poco precisos al momento de representar la forma del microorganismo, o bien son tan complejos que el cálculo resulta extremadamente lento. En general existe un compromiso ineludible entre la precisión y la practicidad.

Si bien la estimación de biovolumen por microscopía óptica es el método más común, suele arrojar resultados sesgados y no comparables. Una solución a esta problemática sería proveer un sistema que realice el recuento de biovolumen de una manera más precisa, eficaz y rápida. Se buscará entonces ofrecer mediante MHD una herramienta para abordar este problema mediante el acceso a la información cuantitativa de fase.

1.4.2. Identificación automática de especímenes

La diversidad de formas y tamaños que presentan tanto organismos vivientes como objetos inertes, impone la necesidad de contar con sistemas automatizados de identificación. La identificación y conteo de organismos es indispensable para poder realizar estudios de diversidad, estructura de poblaciones y trama trófica, entre otros.

En particular, la diversidad morfológica de los organismos del plancton (fito y zooplancton) es un factor directamente relacionado a su suspensión en la columna de

agua [Sma70]. Al mismo tiempo, los organismos del fitoplancton son de gran envergadura ecológica ya que comprenden la mayor porción de productores primarios en el mar y pueden ser usados para identificar regiones naturales de los océanos [RLG⁺90].

Existen distintos analizadores de imágenes para fito y zooplancton que en su mayoría utilizan las mediciones de las formas de los organismos como son el área, el ancho, el largo y la relación largo-ancho. Desde el campo de la óptica se han hecho notables aportes, por ejemplo mediante el análisis de patrones de difracción [RR87] o con métodos para la identificación automática de microorganismos a partir de las imágenes de intensidad a las que se accede mediante un microscopio óptico [PPCÁBC01, ABMPCPPP02, MPABGE06].

Con inspiración en estos trabajos, y aprovechando los atributos propios de la MHD, se buscará abordar en esta tesis la identificación de especies a partir de hologramas digitales. En este sentido, la Transformada de Fourier Mellin [CP76, DG01] emerge como filtro invariante ante traslaciones, rotaciones y cambios de escala.

En lo que se refiere a la detección del parásito *T. cruzi*, la notoria movilidad del parásito repercute en cambios en los mapas de fase correspondientes. Se intentará diseñar un método de detección basado en la comparación de dos hologramas con el fin de discriminar el parásito frente a su contexto, un fondo comparativamente uniforme.

1.5. Organización de la Tesis

Esta tesis se divide en 3 grandes partes; la primera, dedicada a los aspectos teóricos necesarios para la implementación de la MHD (Capítulo 2 y Capítulo 3); la segunda, a la implementación de la técnica propiamente dicha, incluido el tratamiento de los mapas de fase y el procesamiento de los hologramas (Capítulo 4, Capítulo 5, Capítulo 6 y Capítulo 7); y la tercera, a las aplicaciones desarrolladas particularmente para la caracterización de microorganismos (Capítulos 8, 9 y 10).

En el Capítulo 2, se presentan los fundamentos de la Teoría Escalar de la Difracción y Sistemas Lineales. Éstos constituyen los fundamentos necesarios para comprender el proceso de reconstrucción de un holograma.

Con estos basamentos en el Capítulo 3, se describe la Holografía, haciendo especial hincapié en las consideraciones prácticas necesarias para registrar adecuadamente un holograma digital y en los métodos de reconstrucción numérica. Asimismo, se realiza una descripción teórica de la MHD, como una alternativa a la microscopía convencional que incluye las bondades de la holografía.

Luego, se realiza una descripción de las consideraciones prácticas tenidas en cuenta para la implementación de la MHD (Capítulo 4). Para ello, se realiza un análisis

crítico de las características (ópticas, mecánicas, de estabilidad, etc.) que debe presentar el dispositivo óptico a desarrollar, en función del equipamiento disponible y de los objetivos planteados y se muestran las experiencias preliminares relacionadas con la implementación de la técnica. Se ensayan diversos algoritmos numéricos de reconstrucción: Aproximación de Fresnel, Método de la Convolución de Huygens y Método de Propagación del Espectro Angular. Por último, se evalúa el desempeño de los mismos, realizando un estudio comparativo y advirtiendo las ventajas y desventajas de cada uno, para la caracterización de microorganismos.

En el Capítulo 5, se realiza una revisión de los métodos de desenvolvimiento de fase bidimensional. Dentro de los métodos locales, se aplica el método de desenvolvimiento mediante mapas de calidad. Como este método exige la elección de un mapa guía para desenvolver la fase, se propone el uso de la imagen de amplitud con este fin. Como contraparte, y con fines comparativos, se implementa el método global de desenvolvimiento de fase por cuadrados mínimos. Se exploran las ventajas y limitaciones de ambos métodos y se exhiben los resultados. Adicionalmente, como aporte original, se propone un algoritmo de desenvolvimiento de fase con dos longitudes de onda que busca extraer la información de fase a partir de la información que ofrecen los mapas envueltos con cada longitud de onda.

En el Capítulo 6 se ensayan algunas técnicas de procesamiento digital de imágenes para mejorar la calidad de los hologramas reconstruidos y automatizar gran parte del proceso de reconstrucción. Esto supone la propuesta de un conjunto de métodos originales para abordar distintos aspectos: eliminar el orden cero de difracción, el tratamiento semi-automático del espectro del holograma y el ensayo de diversos filtros con distintos grados de dureza para mejorar la calidad de las imágenes de amplitud y de contraste de fase. Al mismo tiempo, se implementa un mecanismo de autofocus, evitando así la necesidad de conocer previamente las distancias de enfoque adecuadas y contribuyendo a la automatización de todo el sistema. Asimismo, se estudian e implementan métodos de segmentación de imágenes para extraer la región de interés (ROI) para las aplicaciones relacionadas con la caracterización de microorganismos.

El Capítulo 7 está dedicado a la corrección de las aberraciones propias de la configuración para MHD. Se ensaya y adapta un método propuesto en la literatura para la corrección de la aberración por configuración *off-axis*, y adicionalmente se contribuye de manera original con un método simple y automático para la corrección de la aberración esférica de fase que introduce el Objetivo de Microscopio. Asimismo, se propone un método rápido y eficaz para corregir la aberración de fase que surge por *efecto rolling shutter* o *efecto persiana* cuando se utiliza un sensor CMOS como medio de registro del holograma.

Por último, en los Capítulos 8, 9 y 10 se presentan las aplicaciones de la MHD a la caracterización de microorganismos, en particular al parásito *T. cruzi* y a la microalga *C. hirundinella*. La propuesta para la detección de *T. cruzi* se realiza en el Capítulo 8. Por su parte, las propuestas realizadas para la caracterización de

microalgas se reservan para los siguientes capítulos. En particular se experimenta con la especie *Ceratium hirundinella* que es de sustancial interés biológico en los estudios ecológicos regionales. En el Capítulo 9 se realizan los cálculos de biovolumen a partir de los mapas de fase desenvuelta y se propone un método híbrido, basado en MHD y técnicas de PDI para la determinación del biovolumen. De ella se desprende la estimación simultánea de un *índice de refracción efectivo*. Por último, en el Capítulo 10 se implementa la Transformada de Fourier Mellin (TFM) como descriptor invariante para intentar lograr la identificación automática de esta especie. Para ello se discuten los criterios que deben adoptarse. Se propone como contribución original un descriptor basado en la TFM y se definen métricas de evaluación de desempeño; la puesta a punto de la técnica se lleva a cabo con caracteres conocidos (letras) y luego se ensaya el método con microalgas de la especie *Ceratium* y *Pediastrum*, evaluando su sensibilidad y eficacia.

Finalmente se presenta una Discusión General que abarca el análisis global de los resultados, y las perspectivas de investigación en esta línea en el mediano plazo.

2. Fundamentos Teóricos I

La Microscopía Holográfica Digital (MHD) tiene sus bases teóricas fundamentalmente en dos procesos ópticos, la interferencia y la difracción. El proceso de registro de un holograma involucra un proceso interferométrico que se describirá en el siguiente capítulo; la difracción, en tanto, representa el papel clave del proceso de reconstrucción de un holograma. No obstante, los aspectos teóricos inherentes requieren de un análisis más exhaustivo que se realizará en el presente capítulo.

SOMMERFELD definió la difracción como la propagación no rectilínea de la luz que no se puede interpretar a partir de las leyes de la reflexión y de la refracción. GRIMALDI, en el siglo XVII, fue el primero que observó fenómenos difractivos; al hacer pasar un haz de luz a través de una abertura practicada sobre una pantalla observó que al proyectar el haz sobre otra pantalla el paso de la zona iluminada a la zona de sombra no era abrupto (como indica la propagación rectilínea). Años después, FRESNEL realizó el primer intento serio de explicar los fenómenos de difracción (1818), proponiendo algunas mejoras a las ideas intuitivas aunque poderosas de HUYGENS, quien había supuesto que cada punto de un frente de onda de la perturbación óptica podía considerarse como una nueva fuente de «onditas secundarias». FRESNEL sugirió que las «onditas» de HUYGENS podían interferir de acuerdo al principio de interferencia de YOUNG, y adicionó algunas suposiciones arbitrarias respecto de las fases y amplitudes de las mismas. Fue recién en 1882, cuando estas ideas intuitivas lograron conjugarse dentro de un fundamento matemático formal gracias a las propuestas de KIRCHHOFF, quien mostró que las amplitudes y fases atribuidas a las fuentes secundarias eran una consecuencia lógica de la naturaleza ondulatoria de la luz y propuso la explicación de los fenómenos de difracción en términos de una teoría escalar. Su teoría tenía inconsistencias formales de orden matemático que fueron salvadas por SOMMERFELD en 1894, introduciendo algunas modificaciones. Como consecuencia, la formulación de KIRCHHOFF del principio de *Huygens-Fresnel* se considera una primera aproximación que proporciona resultados que concuerdan con los experimentos de manera aceptable, mientras que las modificaciones de SOMMERFELD amplían los límites de validez. Formalmente, la formulación se denomina *Teoría de la Difracción de Rayleigh-Sommerfeld*.

La teoría escalar es suficientemente rigurosa para explicar la mayor parte de los resultados experimentales macroscópicos. Pese a que se trata de una simplificación que no tiene en cuenta el carácter vectorial de los campos electromagnéticos, funciona con éxito cuando las aberturas son más grandes que la longitud de onda de la luz y cuando las distancias de observación son suficientemente grandes. En estas condi-

ciones, la polarización del campo electromagnético no es una información relevante y, por lo tanto, se puede prescindir del formalismo vectorial.

En este capítulo se presentan las bases de la Teoría escalar de la Difracción y varios conceptos que se requieren para el desarrollo de la teoría, práctica y aplicación de la microscopía holográfica.

2.1. Perturbación Óptica y Amplitud Compleja

El modelo ondulatorio describe a la luz como una oscilación electromagnética transversal. De las *Ecuaciones de Maxwell* se desprende que el campo eléctrico \vec{E} y el magnético \vec{B} se acoplan para dar origen a un campo electromagnético que satisface la ecuación de onda. Restringimos nuestra atención a \vec{E} ya que los medios de registro usados en holografía responden primordialmente a este campo. El campo eléctrico puede caracterizarse esencialmente por su amplitud, fase, polarización y dirección de propagación. Cuando la luz es dispersada o reflejada por la superficie de un objeto opaco, o bien cuando es transmitida a través de un medio transparente, cualquiera de estas características se altera. Al medir esos cambios, mediante técnicas adecuadas, se obtiene información del estado del objeto.

El campo eléctrico \vec{E} es una cantidad vectorial, lo que significa que puede vibrar en cualquier dirección perpendicular a la dirección de propagación. En muchas situaciones, como las que se tratarán en nuestras aplicaciones, puede considerarse sólo una componente del vector \vec{E} de modo que la luz puede tratarse como un fenómeno escalar, y asumiendo que cualquier otra componente de interés se tratará independientemente de una manera similar. Como consecuencia, al descartarse la naturaleza vectorial del campo eléctrico, \vec{E} se reemplaza por la cantidad escalar $u(x, y, z, t)$ denominada *perturbación óptica*. De este modo, una onda de luz se denota en el caso más general por:

$$u(x, y, z, t) = \text{Re}(U(x, y, z) \exp(i\omega t))$$

ω designa la frecuencia angular (relacionada con la frecuencia ν mediante $\omega = 2\pi\nu$) y $U(x, y, z)$ se denomina *amplitud compleja* de la luz y está dada por:

$$U(x, y, z) = a(x, y, z) \exp(-i\phi(x, y, z)) \quad (2.1)$$

Donde $a(x, y, z)$ es la amplitud real de la onda y $\phi(x, y, z)$ es la fase espacial. Dado que las frecuencias temporales de la luz son tan altas, no es necesario considerar la dependencia temporal $\exp(i\omega t)$ explícitamente. La amplitud compleja $U(x, y, z)$ contiene toda la información acerca de la estructura espacial de las ondas de luz, lo que es esencial para nuestro propósito.

La Ecuación 2.1 es la expresión más general para describir la perturbación óptica en el espacio; no está restringida sólo a una onda plana, sino una onda cualquiera

tridimensional donde tanto la amplitud como la fase pueden ser funciones de x , y y z . Con este enfoque, se puede demostrar que el hecho de que el campo óptico satisfaga la ecuación de onda, es equivalente a que la amplitud compleja obedezca la ecuación de Helmholtz:

$$(\nabla^2 + k^2) U = 0$$

con k el *número de onda* dado por: $k = 2\pi/\lambda$ y λ la longitud de onda.

En lo que se refiere al registro de la luz, no existe un soporte capaz de registrar la fase de la perturbación óptica. Los detectores usuales (retina, películas fotográficas, sensores electrónicos) registran la irradiancia o intensidad, que es proporcional al módulo de la amplitud al cuadrado, esto es $I \propto |U|^2 = a^2$.

2.1.1. La onda plana

La onda electromagnética más simple es la onda plana linealmente polarizada; se dice que la onda es plana cuando en cualquier instante de tiempo su fase tiene el mismo valor sobre un plano normal a la dirección de propagación, y linealmente polarizada cuando en cualquier punto de ese plano la dirección de \vec{E} es la misma. En términos de la amplitud compleja, dada por la Ecuación 2.1, la onda plana resulta un caso particular para el cual la fase es constante sobre un plano, perpendicular a la dirección de propagación; esto es, $\phi(x, y, z) = \vec{k} \cdot \vec{r} + \phi_0 = \text{const}$, sobre el plano $\vec{k} \cdot \vec{r} = \text{const}$. En este caso, $\vec{r} = x\hat{x} + y\hat{y} + z\hat{z}$ es el vector posición de un punto P en el espacio, a es la amplitud de la onda. La dirección en la que viaja una onda está descrita por su vector de propagación \vec{k} , de magnitud el número de onda k ; y ϕ_0 es la constante de fase o fase inicial. La relación entre la frecuencia y la longitud de onda es $\lambda\nu = v$, con v la velocidad de propagación de la onda.

Por lo tanto, la amplitud compleja de una onda plana, según el sistema coordenado de la Figura 2.1 está dada por la expresión:

$$\begin{aligned} U(x, y, z) &= a \exp \left[-i \left(\vec{k} \cdot \vec{r} + \phi_0 \right) \right] \\ &= a(x, y, z) \exp \left[-i2\pi \left(\frac{\cos \alpha}{\lambda} x + \frac{\cos \beta}{\lambda} y + \frac{\cos \gamma}{\lambda} z \right) \right] \end{aligned} \quad (2.2)$$

donde, α , β y γ son, respectivamente, los ángulos entre la dirección de propagación de la onda y los ejes x , y y z . Las cantidades $\cos \alpha$, $\cos \beta$, y $\cos \gamma$ se llaman *cosenos directores* de la onda. Los frentes de onda de una onda plana son así planos perpendiculares al vector de onda \vec{k} , tal como el que se muestra en la Figura 2.1.

La Ecuación 2.2, puede también ser escrita en términos de las frecuencias espaciales con las que los sucesivos frentes de onda interceptan los planos xy y zy del sistema coordenado de la Figura 2.1:

$$U(x, y, z) = a(x, y, z) \exp \left[-i2\pi (f_x x + f_y y + f_z z) \right] \quad (2.3)$$

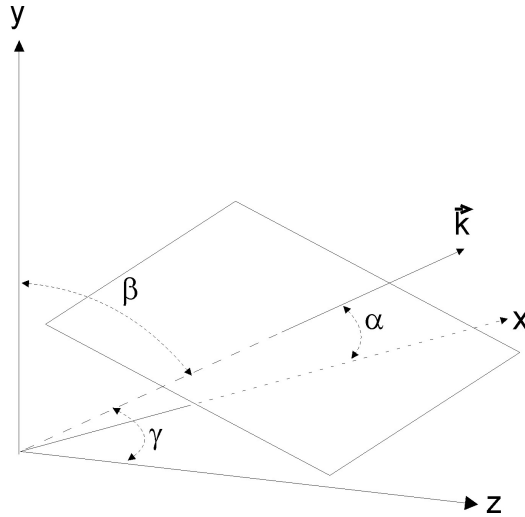


Figura 2.1.: Onda plana con vector de propagación.

Las frecuencias f_x, f_y, f_z están estrechamente ligadas a los cosenos directores, y por esta razón no son independientes sino que se encuentran vinculadas mediante la expresión:

$$f_x^2 + f_y^2 + f_z^2 = \frac{1}{\lambda^2} \quad (2.4)$$

Por ejemplo, para una onda plana cuyo vector de onda yace en el plano $y - z$, las intersecciones de los sucesivos frentes de onda con este plano se muestran en la Figura 2.2.

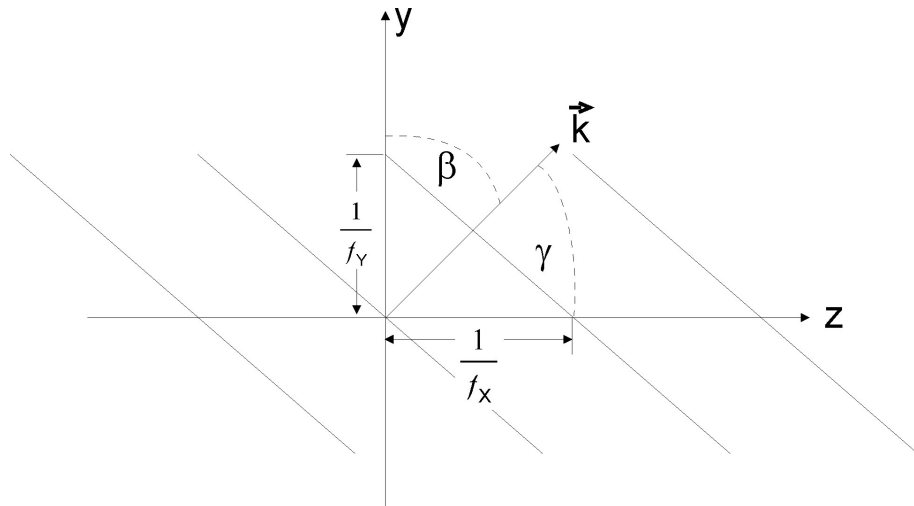


Figura 2.2.: Intersección sucesivos frentes de onda con el plano $y-z$. El vector de onda yace en ese plano.

2.1.2. La onda esférica - Aproximación de Fresnel

El modelo de la onda esférica representa la onda de luz emitida por una fuente puntual. Su amplitud compleja se describe por:

$$U = \frac{a}{r} \exp(ikr) \quad (2.5)$$

con r la distancia radial del punto fuente al punto de observación P . Se advierte que la amplitud de la onda decrece conforme la distancia de P al punto fuente aumenta, y que la fase de la onda es constante cuando $r = \text{const}$; esto es, los frentes de onda son esferas centradas en el punto fuente.

Si se considera, como se muestra en la Figura 2.3 un punto fuente que descansa en el plano x_0y_0 en un punto de coordenadas x_0, y_0 , la distancia radial a un punto P dentro de un plano x, y ubicado a una distancia z del plano x_0y_0 es: $r = \sqrt{z^2 + (x - x_0)^2 + (y - y_0)^2}$. Puesto que si se reemplazara esta expresión en la Ecuación 2.5, surgirían dificultades desde el punto de vista algebraico, en algunas circunstancias es deseable realizar ciertas aproximaciones.

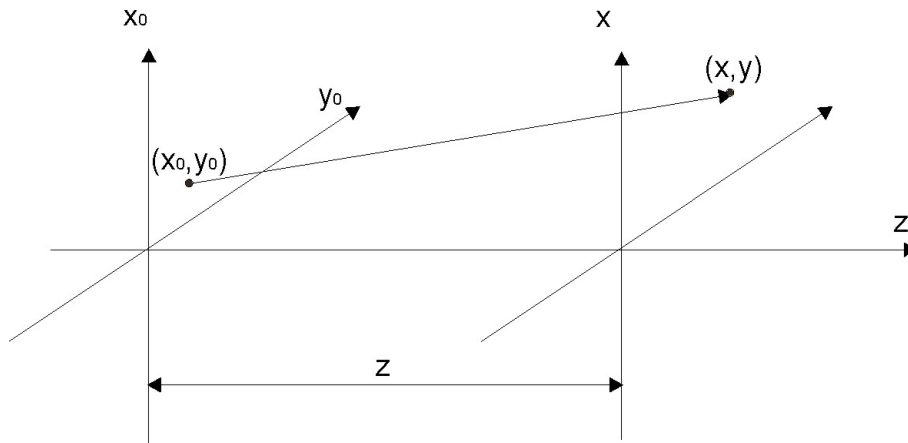


Figura 2.3.: Esquema onda esférica

Cuando la distancia z es mucho más grande que las dimensiones $(x - x_0)$ y $(y - y_0)$, es válido suponer que no se comete error apreciable al aproximar r por z en el denominador de la Ecuación 2.5. No obstante, cabe observar que z no puede reemplazarse en la fase de dicha ecuación pues los errores resultantes por propagación estarían multiplicados por k , un número muy grande que originaría errores de fase mucho mayores a 2π radianes. Una aproximación conveniente para la fase surge de realizar una expansión binomial de la raíz cuadrada:

$$\begin{aligned} r &= z \sqrt{1 + \left(\frac{x-x_0}{z}\right)^2 + \left(\frac{y-y_0}{z}\right)^2} \\ &\approx z \left[1 + \frac{1}{2} \left(\frac{x-x_0}{z}\right)^2 + \frac{1}{2} \left(\frac{y-y_0}{z}\right)^2 \right] \end{aligned} \quad (2.6)$$

donde r se aproxima por los dos primeros términos de la expansión. Esta aproximación se denomina *Aproximación de Fresnel*. Un estudio más exhaustivo de las condiciones de validez será realizado posteriormente. Así, la amplitud compleja en el plano xy resulta:

$$U(x, y, z) = \frac{a}{z} \exp[ikz] \exp i(k/2z) [(x - x_0)^2 + (y - y_0)^2] \quad (2.7)$$

2.1.3. La fase como portadora de información

Examinemos nuevamente la fase en Ecuación 2.2 y Ecuación 2.5. Para una onda plana se tiene: $\phi = \vec{k} \cdot \vec{r} + \phi_0$. Si suponemos, sin pérdida de generalidad que la onda se propaga en la dirección del eje z , y que la fase inicial $\phi_0 = 0$, el vector de propagación se escribe $\vec{k} = k\hat{z}$, por lo que la expresión de la fase se simplifica y resulta:

$$\phi = kz \quad (2.8)$$

Por su parte, para una onda esférica:

$$\phi = kr \quad (2.9)$$

De acuerdo con esto, la fase de una onda monocromática puede modificarse tanto si se altera cualesquiera de los dos factores involucrados en Ecuación 2.8 y Ecuación 2.9. Así, ésta se altera con tan sólo propagarse en el espacio (esto es, conforme aumenta z para una onda plana y r para la onda esférica), pero además si k , o lo que es lo mismo la longitud de onda λ , cambia.

Cuando la luz atraviesa un medio diferente del vacío; su velocidad de propagación disminuye, y por ende su longitud de onda también, ya que la frecuencia permanece constante. Como consecuencia la fase de la luz se altera; la medida de ese cambio puede usarse para estudiar las propiedades de dicho medio. La relación de la velocidad c de la luz en el vacío a la velocidad v en un medio se conoce como *índice de refracción* n del medio:

$$n = \frac{c}{v} \quad (2.10)$$

mientras que la longitud de onda λ de la luz en dicho medio se relaciona con la longitud de onda en el vacío λ_0 mediante:

$$\lambda = \frac{\lambda_0}{n} \quad (2.11)$$

Esto significa que la fase se modifica según:

$$\phi_{plana} = n\vec{k} \cdot \vec{r}$$

para la onda plana y

$$\phi_{esférica} = nkr$$

para la onda esférica; con $k = \frac{2\pi}{\lambda_0}$, el número de onda para la luz en el vacío.

En términos generales, el índice de refracción de cualquier medio transparente se altera ante cambios de temperatura, concentración, etc. y consecuentemente también lo hace la fase. La medida de esas alteraciones son medidas indirectas del estado de los objetos bajo estudio. Particularmente, para nuestros propósitos, la fase de la luz se entiende como portadora de información de nuestros objetos de estudio, las microalgas. El material fitoplanctónico - tal como la mayor parte de los seres vivos - contienen entre un 40 % y un 90 % de agua; el resto es contenido citoplasmático, lípidos, diversos tipos de clorofila, entre otros. Claramente esto supone que el índice de refracción promedio asociado a una microalga es diferente del índice de refracción del agua y consecuentemente, involucra un retardo en la fase de la luz que la atraviesa.

La fase puede expresarse en términos de una cantidad útil llamada *longitud de camino óptico* (LCO, en adelante):

$$LCO = n \times LCG$$

con LCG , la *longitud de camino geométrico*, de modo que $\phi = k \times LCO$.

2.2. Sistemas Lineales

En general, cuando la luz interacciona con algún elemento óptico u obstáculo sus propiedades se modifican. El proceso, por muy complejo que sea y aun cuando haya varios elementos ópticos involucrados, puede entenderse como un *sistema* que realiza un mapeo de la distribución de luz de *entrada* y devuelve como *salida* una distribución de luz modificada. Se dice que la respuesta del sistema puede ser *Lineal* o *No Lineal*, y de acuerdo a ello la teoría adecuada para describir el fenómeno será dentro del marco de la *Óptica Lineal* y la *Óptica No Lineal* respectivamente.

Una representación conveniente para un sistema cualquiera es el operador matemático $S\{\}$, que opera sobre una función de entrada para producir una función de salida. Si $g_1(x_1, y_1)$ representa la entrada del sistema y $g_2(x_2, y_2)$ es la correspondiente salida, entonces se cumple:

$$g_2(x_2, y_2) = S\{g_1(x_1, y_1)\} \quad (2.12)$$

Se dice que un sistema es *lineal* cuando tiene la propiedad de que su respuesta a varios estímulos que actúan simultáneamente es igual a la suma de las respuestas que cada estímulo componente produciría individualmente. Matemáticamente, para cualesquiera funciones de entrada t y s y cualesquiera constantes complejas \tilde{a} y \tilde{b} , la salida del sistema es tal que:

$$S\{\tilde{a}s(x_1, y_1) + \tilde{b}t(x_1, y_1)\} = \tilde{a}S\{s(x_1, y_1)\} + \tilde{b}S\{t(x_1, y_1)\}$$

2.2.1. Integral de superposición - Respuesta Impulsiva

En particular, la linealidad de la ecuación de ondas, que describe la propagación de la luz a través de diversos medios, nos permite analizar la operación óptica de formación de imágenes como un *mapeo lineal* de la distribución de luz del objeto, en la distribución de luz de la imagen. La gran ventaja que otorga la *linealidad*, es la habilidad de un sistema para expresar la respuesta (ya sea de amplitud de luz o intensidad de luz) a complicados estímulos, en términos de ciertos estímulos «elementales». Esto significa que un estímulo de entrada cualquiera se descompone en una combinación lineal de estímulos elementales, cada uno de los cuales produce una respuesta conocida. La respuesta completa se obtiene como la combinación lineal de las respuestas a cada estímulo individual.

En este sentido, no es difícil imaginar un objeto luminoso arbitrario como un conjunto de fuentes puntuales bien localizadas una al lado de la otra (Figura 2.4).

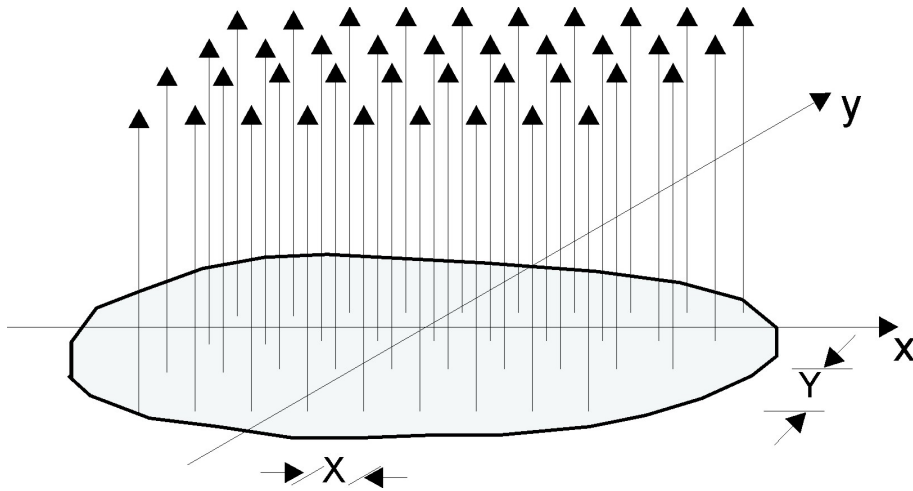


Figura 2.4.: Impulsos Deltas representando fuentes puntuales de un objeto luminoso

Esta visión, aunque simple, es poderosa desde el punto de vista de la *Teoría de los Sistemas Lineales*, pues los estímulos elementales más convenientes para describir la entrada a un sistema son funciones *impulso* δ . Matemáticamente, esto implica que cualquier función g_1 (que para nuestros propósitos representa un objeto luminoso) se puede expresar como una combinación lineal de funciones δ desplazadas y pesadas convenientemente. Esta idealización se sustenta en la «*propiedad de tamizado*» de la función δ , la cual establece:

$$g_1(x_1, y_1) = \iint_{-\infty}^{\infty} g_1(\xi, \eta) \delta(x_1 - \xi, y_1 - \eta) d\xi d\eta$$

La respuesta g_2 del sistema a la entrada g_1 teniendo en cuenta la Ecuación 2.12 y la

propiedad de linealidad resulta:

$$g_2(x_2, y_2) = S \left\{ \iint_{-\infty}^{\infty} g_1(\xi, \eta) \delta(x_1 - \xi, y_1 - \eta) d\xi d\eta \right\} = \iint_{-\infty}^{\infty} g_1(\xi, \eta) S \{ \delta(x_1 - \xi, y_1 - \eta) \} d\xi d\eta$$

donde $g_1(\xi, \eta)$ es considerado simplemente como un factor de peso aplicado a la función elemental $\delta(x_1 - \xi, y_1 - \eta)$. Decimos entonces que la salida del sistema es una combinación lineal de respuestas a los estímulos elementales - los impulsos - o, lo que es equivalente, una combinación lineal de *respuestas impulsivas*. Definimos así la respuesta de un sistema en el punto (x_2, y_2) del espacio de salida a una función de entrada δ en las coordenadas (ξ, η) del espacio de entrada como:

$$h(x_2, y_2; \xi, \eta) = S \{ \delta(x_1 - \xi, y_1 - \eta) \} \quad (2.13)$$

La función h se denomina *respuesta impulsiva* del sistema o *función de punto extendido*. La entrada y la salida de un sistema quedan relacionadas mediante:

$$g_2(x_2, y_2) = \iint_{-\infty}^{\infty} g_1(\xi, \eta) h(x_2, y_2; \xi, \eta) d\xi d\eta \quad (2.14)$$

Esto es, un sistema lineal se encuentra completamente caracterizado por su respuesta a impulsos unitarios. Para especificar completamente la salida de un sistema, las respuestas para impulsos localizados en todos los puntos del plano de entrada deben conocerse con exactitud. Para el caso de un sistema lineal formador de imágenes, este resultado tiene una interpretación física interesante: el efecto de los elementos formadores de imágenes (lentes, máscaras, etc.) pueden describirse completamente especificando las imágenes de las fuentes puntuales localizadas en todo el objeto. La Ecuación 2.14 se conoce como *integral de superposición*.

2.2.2. Sistemas Lineales Invariantes - Función de Transferencia

Un sistema formador de imágenes es espacialmente invariante si la respuesta impulsiva definida en la Ecuación 2.13, depende sólo de las distancias $(x_2 - \xi)$ y $(y_2 - \eta)$, es decir:

$$h(x_2, y_2; \xi, \eta) = h(x_2 - \xi, y_2 - \eta)$$

Físicamente la interpretación es que un sistema formador de imágenes es espacialmente invariante si, la imagen de una fuente puntual cambia solo en posición y no en su forma funcional a medida que la fuente puntual recorre el campo objeto. Para un sistema invariante la integral de superposición dada por la Ecuación 2.14 se convierte en:

$$g_2(x_2, y_2) = \iint_{-\infty}^{\infty} g_1(\xi, \eta) h(x_2 - \xi, y_2 - \eta) d\xi d\eta \quad (2.15)$$

donde, de acuerdo con los basamentos matemáticos dados en el Apéndice A reconocemos una integral de *convolución doble* de la función objeto con la respuesta impulsiva del sistema. Así, para obtener la salida de un sistema lineal espacialmente invariante basta con realizar la convolución de la entrada con la respuesta impulsiva del sistema, de modo que denotamos $g_2 = g_1 \otimes h$.

Si realizamos la *Transformada de Fourier* de ambos miembros en la Ecuación 2.15 e invocamos el *Teorema de la Convolución* de la Transformada de Fourier (Ver Apéndice A), el espectro de la entrada $G_1(f_x, f_y)$ y el de salida $G_2(f_x, f_y)$ estarán relacionados simplemente mediante:

$$G_2(f_x, f_y) = H(f_x, f_y) G_1(f_x, f_y) \quad (2.16)$$

donde H es la Transformada de Fourier de la respuesta impulsiva y se denomina *función de transferencia*. Ésta indica los efectos del sistema en el dominio de las frecuencias.

$$H(f_x, f_y) = \iint_{-\infty}^{\infty} h(\xi, \eta) \exp[-i2\pi(f_x\xi + f_y\eta)] d\xi d\eta \quad (2.17)$$

De este modo, a partir de la Ecuación 2.16 y la Ecuación 2.17 se aprecia que los sistemas lineales invariantes presentan una estructura matemática mucho más simple que los sistemas que son sólo lineales. Esto es así ya que para sistemas invariantes, la entrada puede descomponerse en funciones elementales aún más convenientes que las funciones δ , las funciones exponenciales complejas. Es claro que al transformar Fourier g_1 , la entrada se descompone en una combinación lineal de funciones exponenciales complejas de distintas frecuencias espaciales. La multiplicación del espectro de entrada G_1 por la función de transferencia H incorpora los efectos del sistema en cada función elemental. Estos efectos implican simplemente un cambio de amplitud y un desplazamiento en la fase, ya que sólo se está multiplicando el espectro de entrada por el número complejo $H(f_x, f_y)$ en cada (f_x, f_y) . Una transformada inversa de Fourier del espectro de salida G_2 sintetiza la salida del sistema g_2 sumando todas las funciones elementales modificadas.

2.3. Difracción

Cuando la luz viaja a través de un objeto de transmisión (una placa fotográfica, red de difracción o un holograma), su amplitud compleja se altera [C.79]. La función que describe esta alteración se denomina amplitud de *transmitancia* de un objeto y se la simboliza con t . Ésta se define como la razón entre la amplitud de salida y la amplitud de entrada. Si la superficie del objeto es paralela al plano xy , se tiene (Figura 2.5):

$$U_o(x, y) = t(x, y) U_i(x, y) \quad (2.18)$$

Si el objeto afecta sólo a la amplitud de la luz transmitida, se le llama *objeto de amplitud*, mientras que si afecta solamente a la fase de la luz transmitida, se denomina *objeto de fase*. Ejemplos de objetos de fase son aquellos que presentan en su superficie variaciones de espesor o de índice de refracción. En general, un objeto de transmisión afecta tanto a la amplitud como a la fase.

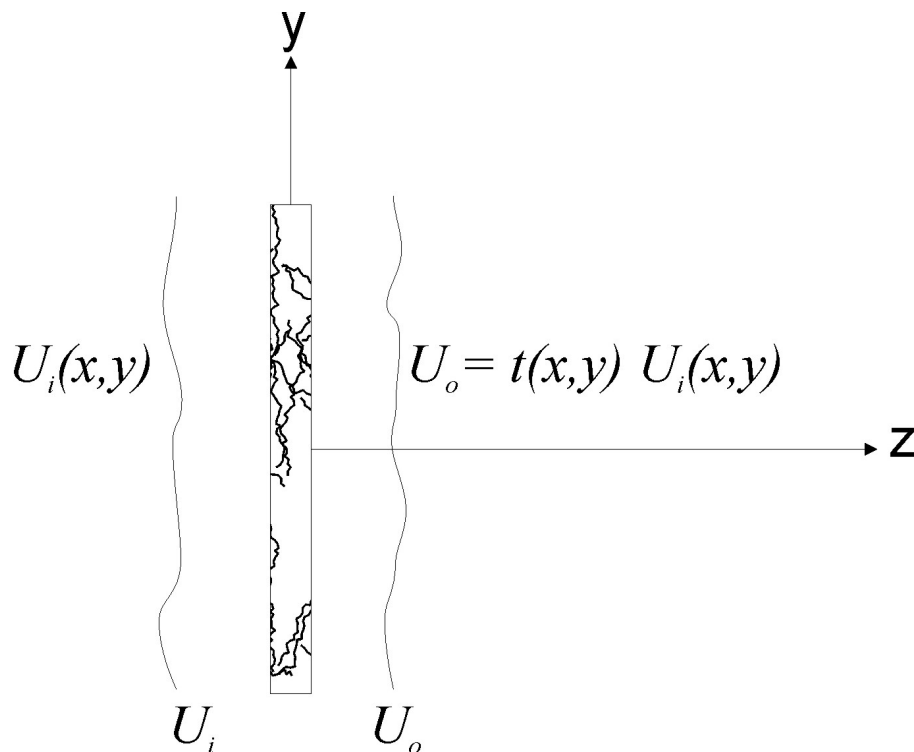


Figura 2.5.: Objeto de transmisión paralelo al plano xy .

Para obtener la amplitud compleja de la onda a una distancia $z > 0$, ésta debe propagarse mediante los formalismos matemáticos propuestos por SOMMERFELD.

A continuación se introducirán los lineamientos teóricos que permiten conocer cómo cambia la estructura espacial de una perturbación óptica al desplazarse en el espacio, luego de haber sido difractada por algún objeto. En efecto, se delinean dos formalismos que describen adecuadamente el fenómeno: la formulación de KIRCHHOFF y los efectos de la difracción en el espectro angular de la perturbación óptica. Los fundamentos teóricos relativos al fenómeno de difracción serán de crucial importancia para la reconstrucción numérica de hologramas digitales.

2.3.1. Resultados de la teoría de Kirchhoff

La formulación de KIRCHHOFF de la difracción está basada en el teorema integral de Green; un estudio y análisis detallado se encuentra en GOODMAN [Goo68]. Para nuestros propósitos, bastará con presentar aquí los resultados más importantes.

Considérese el problema de la difracción por una apertura en una pantalla opaca plana infinita. Como se muestra en la Figura 2.6, se considera una fuente puntual S ubicada en un plano de coordenadas (ξ, η) , emitiendo una onda esférica U que se propaga libremente hasta que alcanza un obstáculo, una apertura difractante Σ que descansa en un plano de coordenadas (x, y) .

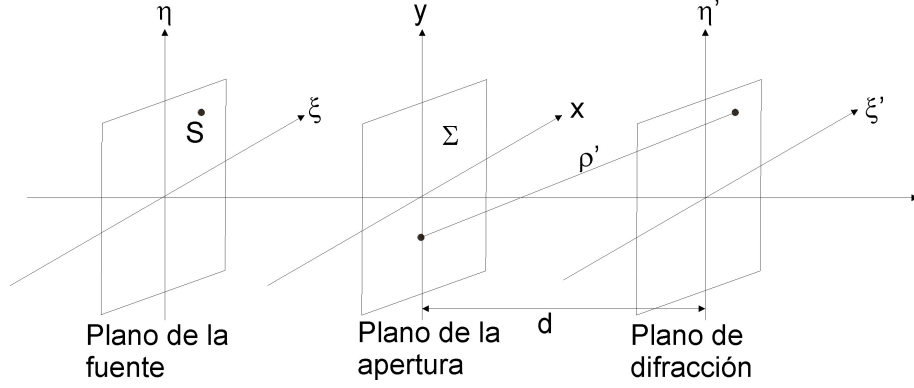


Figura 2.6.: Geometría para estudiar la difracción.

En el plano de la apertura, la amplitud compleja de la onda es $U(x, y)$. La estructura de la apertura plana es arbitraria. Por ejemplo, si se considera una abertura rectangular en una pantalla opaca, la función de transmitancia asociada es:

$$t(x, y) = \begin{cases} 1 & \text{en } \Sigma \\ 0 & \text{en c.o.c.} \end{cases}$$

Una vez que la onda atraviesa la apertura, puede demostrarse [Goo68] que el campo complejo $\Psi(\xi', \eta')$ de la onda en cualquier plano de observación (ξ', η') ubicado a una distancia d de la apertura, está dado por la integral de FRESNEL-KIRCHHOFF (siempre que $d \gg \lambda$):

$$\begin{aligned} \Psi(\xi', \eta') &= \frac{i}{\lambda} \iint_{-\infty}^{\infty} U_o(x, y) \frac{\exp\left[-i\frac{2\pi}{\lambda}\rho'\right]}{\rho'} Q dx dy = \\ &= \frac{i}{\lambda} \iint_{-\infty}^{\infty} t(x, y) U(x, y) \frac{\exp\left[-i\frac{2\pi}{\lambda}\rho'\right]}{\rho'} Q dx dy \end{aligned} \quad (2.19)$$

con ρ' la distancia entre un punto en el plano de la apertura y un punto en el plano de observación, que viene dada por:

$$\rho' = \sqrt{(x - \xi')^2 + (y - \eta')^2 + d^2} \quad (2.20)$$

y Q un factor de inclinación que se introduce en la integral para excluir ondas propagándose hacia atrás, hecho que físicamente no ocurre, y que se expresa mediante:

$$Q = \frac{1}{2} (\cos[\theta] + \cos[\theta'])$$

donde θ es el ángulo entre el rayo que llega a la apertura desde la fuente y el vector unitario \vec{n} perpendicular al plano de la apertura, y θ' el ángulo entre el rayo emergente y \vec{n} (Ver Figura 2.7). En la mayoría de las situaciones prácticas, incluso en Holografía Digital, puede considerarse $Q \sim 1$. De hecho, el factor de inclinación puede considerarse como una corrección *ad hoc* a la integral de difracción, o bien derivarse en la teoría formal de difracción, tal como se hace en la referencia [Goo68].

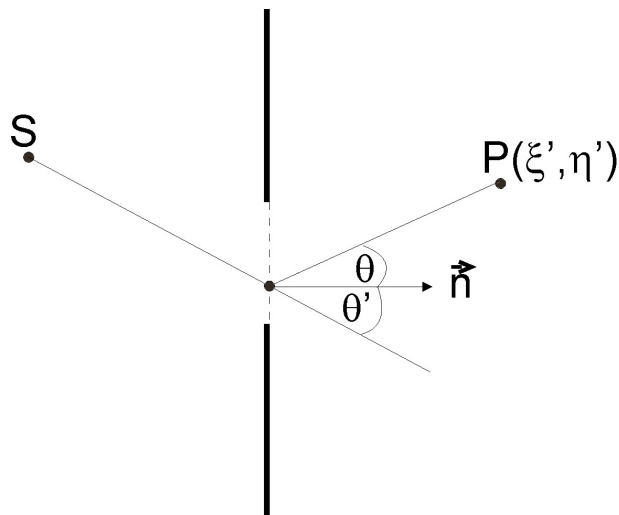


Figura 2.7.: Factor de inclinación.

De la Ecuación 2.19 se desprenden algunas interpretaciones que vale la pena mencionar. Si bien en esta formulación se supuso que la apertura difractante es iluminada por una onda esférica divergente simple, los resultados pueden extenderse cualquiera sea la iluminación que llega a Σ desde el punto S . Esto es así debido a que una onda cualquiera puede descomponerse en una colección infinita de fuentes puntuales y a que la linealidad de la ecuación de onda permite aplicar el principio a cada punto fuente individualmente. Por otro lado, de esta ecuación también se advierte que el campo en el punto $P(\xi', \eta')$ puede interpretarse como la superposición en el plano $\xi'\eta'$ de un conjunto infinito de fuentes ficticias «secundarias» ubicadas dentro de la apertura; curiosamente, estas son similares a las ondas esféricas propuestas por Huygens años antes, pero difieren en amplitud y fase por el factor $\frac{i}{\lambda}$. Por último, para nuestros propósitos es importante notar que la Ecuación 2.19 no es más que una integral de superposición como las que se mencionaron en la Subsección 2.2.1 siendo:

$$\Psi(\xi', \eta') = \iint_{-\infty}^{\infty} h(\xi', \eta'; x, y) U_o(x, y) dx dy$$

siempre que U_o se encuentre dado por la Ecuación 2.18 y la respuesta impulsiva

mediante:

$$h(\xi', \eta'; x, y) = \frac{i}{\lambda} \frac{\exp\left[-i\frac{2\pi}{\lambda}\rho'\right]}{\rho'} Q$$

Las ondas esféricas en el integrando de la Ecuación 2.19 (o en la respuesta impulsiva h) son difíciles de manipular matemáticamente, por lo cual las discusiones de la Subsección 2.1.2 resultan muy útiles. Por cuanto, se puede considerar que ρ' , en el denominador de la Ecuación 2.19, no difiere demasiado de d . Considerando además $Q \approx 1$, la respuesta impulsiva puede aproximarse como:

$$h(\xi', \eta'; x, y) \cong \frac{i}{\lambda d} \exp(-ik\rho')$$

Por otro lado, si los valores de x, y, ξ', η' , son pequeños comparados con la distancia d entre el plano de observación y el plano de la apertura, ρ' (dada por la Ecuación 2.20) puede expandirse de acuerdo a con la Aproximación de Fresnel según la Ecuación 2.6, obteniéndose:

$$\rho' \cong d + \frac{(\xi' - x)^2}{2d} + \frac{(\eta' - y)^2}{2d} \quad (2.21)$$

Con ello, la respuesta impulsiva o factor de peso de la integral de superposición se reduce a:

$$h(\xi', \eta'; x, y) = \frac{i \exp(-ikd)}{\lambda d} \exp\left\{-i\frac{k}{2d}[(\xi' - x)^2 + (\eta' - y)^2]\right\} \quad (2.22)$$

cuando la distancia d es lo suficientemente grande como para que esta aproximación sea correcta, se dice que el observador se encuentra en la región de *Difracción de Fresnel*. Dado que este tratamiento supuso el reemplazo de las «onditas» esféricas de Huygens por superficies cuadráticas, la precisión de tal aproximación será suficiente siempre que se cumpla que los términos de mayor orden de esta expansión involucren cambios de fase mucho menores a un radián.

Aceptando la validez de la aproximación de Fresnel, la integral de superposición puede expresarse de dos formas equivalentes, que se detallan a continuación. De cualquier forma, se obtiene la descripción completa de la perturbación óptica difractada por un obstáculo en cualquier plano de observación, cuya intensidad es:

$$I(\xi', \eta') = |\Psi(\xi', \eta')|^2 \quad (2.23)$$

Y su fase:

$$\phi(\xi', \eta') = \arctan \left[\frac{\text{Im}(\Psi(\xi', \eta'))}{\text{Re}(\Psi(\xi', \eta'))} \right] \quad (2.24)$$

2.3.1.1. Transformación de Fresnel

Desarrollando los binomios y acomodando términos, el campo en el plano de observación resulta:

$$\begin{aligned} \Psi(\xi', \eta') = & \frac{i}{\lambda d} \exp\left[-i\frac{2\pi}{\lambda}d\right] \exp\left[-i\frac{\pi}{\lambda d}(\xi'^2 + \eta'^2)\right] \times \iint_{-\infty}^{\infty} U_o(x, y) \dots \\ & \cdot \exp\left[-i\frac{\pi}{\lambda d}(x^2 + y^2)\right] \exp\left[i\frac{2\pi}{\lambda d}(x\xi' + y\eta')\right] dx dy \end{aligned} \quad (2.25)$$

Esta ecuación se denomina *Aproximación de Fresnel* o *Transformación de Fresnel* debido a su similitud matemática con la *Transformada de Fourier*.

La transformada de Fresnel puede asemejarse a una transformada de Fourier, si se hacen las siguientes sustituciones:

$$f_x = \frac{\xi'}{\lambda d}; \quad f_y = \frac{\eta'}{\lambda d} \quad (2.26)$$

De modo que la Ecuación 2.25 queda:

$$\begin{aligned} \Psi(f_x, f_y) = & \frac{i}{\lambda d} \exp\left[-i\frac{2\pi}{\lambda}d\right] \exp\left[-i\pi\lambda d(f_x^2 + f_y^2)\right] \times \iint_{-\infty}^{\infty} U_o(x, y) \dots \\ & \exp\left[-i\frac{\pi}{\lambda d}(x^2 + y^2)\right] \exp[i2\pi(xf_x + yf_y)] dx dy \end{aligned}$$

Resulta así evidente que la aproximación de Fresnel, a menos de un factor de fase esférica, es la transformada de Fourier bidimensional de la función $U_o(x, y) \exp\left[-i\frac{\pi}{\lambda d}(x^2 + y^2)\right]$:

$$\begin{aligned} \Psi(f_x, f_y) = & \frac{i}{\lambda d} \exp\left[-i\frac{2\pi}{\lambda}d\right] \exp\left[-i\pi\lambda d(f_x^2 + f_y^2)\right] \dots \\ & \times \mathfrak{F}^{-1}\left(U_o(x, y) \exp\left[-i\frac{\pi}{\lambda d}(x^2 + y^2)\right]\right) \end{aligned} \quad (2.27)$$

2.3.1.2. Método de la convolución de Huygens

Una formulación equivalente consiste en interpretar la integral de superposición de FRESNEL-KIRCHHOFF como una convolución e invocar el *Teorema de la Convolución* [SJ05]. De hecho, la Ecuación 2.19 puede escribirse:

$$\Psi(\xi', \eta') = \iint_{-\infty}^{\infty} U_o(x, y) h(\xi', \eta', x, y) dx dy \quad (2.28)$$

Con $h(\xi', \eta', x, y)$ la respuesta impulsiva dada por:

$$h(\xi', \eta', x, y) = \frac{i}{\lambda} \frac{\exp \left[-i \frac{2\pi}{\lambda} \sqrt{d^2 + (x - \xi')^2 + (y - \eta')^2} \right]}{\sqrt{d^2 + (x - \xi')^2 + (y - \eta')^2}} \quad (2.29)$$

por lo que se advierte que el sistema caracterizado por $h(\xi', \eta', x, y) = h(\xi' - x, \eta' - y)$ además de ser lineal es espacialmente invariante. Por ende, la integral de superposición es, de hecho, una convolución $(\Psi(\xi', \eta') = (U_o \otimes h)(\xi', \eta'))$.

De acuerdo al *Teorema de la Convolución*, la transformada de Fourier de la convolución de U_o con h es igual al producto de las transformadas individuales $\mathfrak{F}(U)$ y $\mathfrak{F}(h)$. Esto significa que $\Psi(\xi', \eta')$ puede obtenerse haciendo simplemente las siguientes operaciones matemáticas:

$$\Psi(\xi', \eta') = \mathfrak{F}^{-1} \mathfrak{F} \left(\iint_{-\infty}^{\infty} U_o(x, y) h(\xi', \eta', x, y) dx dy \right) = \mathfrak{F}^{-1} (\mathfrak{F}(U_o) \mathfrak{F}(h))$$

Si la respuesta impulsiva se aproxima de acuerdo con la Ecuación 2.22, su transformada de Fourier o *función de Transferencia* puede calcularse fácilmente:

$$H(f_x, f_y) = \exp(-ikd) \exp \left[i\pi \lambda d (f_x^2 + f_y^2) \right]$$

que expresa los efectos de la difracción de FRESNEL en el dominio de las frecuencias espaciales. El primer factor representa un retardo de fase global que experimenta cualquier componente del espectro mientras se propaga entre dos planos separados una distancia d . El segundo, una dispersión de fase con una dependencia cuadrática en frecuencias.

2.3.2. Propagación del Espectro Angular

Si a la distribución de campo complejo en cualquier plano se lo analiza Fourier, las distintas componentes espaciales pueden identificarse como ondas planas viajando en distintas direcciones. La amplitud del campo en cualquier otro punto puede calcularse agregando las contribuciones de estas ondas planas, con los corrimientos de fase apropiados que sufren, conforme se propagan hasta el punto en cuestión.

Sea U un campo complejo que se propaga en la dirección positiva z hasta que incide sobre el plano xy , donde toma el valor $U(x, y, z=0) = U(x, y)$. El objetivo es modelizar la estructura del campo en un punto arbitrario P ubicado en el plano $\xi'\eta'$ de la Figura 2.6, a una distancia $z = d$.

En el plano xy , la función U sintetizada en sus componentes de Fourier, está dada por:

$$U(x, y) = \iint_{-\infty}^{\infty} A_0(f_x, f_y) \exp[i2\pi(f_x x + f_y y)] df_x df_y \quad (2.30)$$

Es decir $U(x, y)$, está descompuesta en una colección infinita de funciones exponenciales más simples, cada una ponderada por un factor de peso $A_0(f_x, f_y)$. $A_0(f_x, f_y)$ es la transformada de Fourier de U en el plano xy ; esto es:

$$A_0(f_x, f_y) = \iint_{-\infty}^{\infty} U(x, y) \exp[-i2\pi(f_x x + f_y y)] dx dy$$

Ahora bien, la ecuación de una onda plana de amplitud unitaria que se propaga con cosenos directores $(\cos \alpha, \cos \beta, \cos \gamma)$, se escribe, de acuerdo con la Ecuación 2.2, la Ecuación 2.3 y la Ecuación 2.4:

$$U(x, y, z) = \exp \left[i \frac{2\pi}{\lambda} ([\cos \alpha] x + [\cos \beta] y + [\cos \gamma] z) \right] \quad (2.31)$$

donde:

$$\cos \gamma = \sqrt{1 - \cos^2 \alpha - \cos^2 \beta} \quad (2.32)$$

Por lo tanto, en el plano $z = 0$, la función exponencial compleja $\exp[i2\pi(f_x x + f_y y)]$ de la Ecuación 2.30 puede considerarse como una onda plana que se propaga con cosenos directores:

$$\cos \alpha = \lambda f_x, \quad \cos \beta = \lambda f_y, \quad \cos \gamma = \sqrt{1 - (\lambda f_x)^2 - (\lambda f_y)^2} \quad (2.33)$$

La función A_0 , evaluada en las frecuencias $f_x = (\cos \alpha) / \lambda$ y $f_y = (\cos \beta) / \lambda$ se denomina espectro angular de la perturbación $U(x, y, 0)$.

Ahora, la forma de la perturbación $\Psi(\xi', \eta') = U(\xi', \eta', z = d)$ en un plano $\xi'\eta'$ paralelo al plano xy pero a una distancia $z = d$ de él, es:

$$\Psi(\xi', \eta') = \iint_{-\infty}^{\infty} A\left(\frac{\cos \alpha}{\lambda}, \frac{\cos \beta}{\lambda}, d\right) \exp \left[i2\pi \left(\frac{\cos \alpha}{\lambda} \xi' + \frac{\cos \beta}{\lambda} \eta' \right) \right] d\frac{\cos \alpha}{\lambda} d\frac{\cos \beta}{\lambda} \quad (2.34)$$

Y su espectro sobre este plano está representado por:

$$A\left(\frac{\cos \alpha}{\lambda}, \frac{\cos \beta}{\lambda}, d\right) = \iint_{-\infty}^{\infty} \Psi(\xi', \eta') \exp \left[-i2\pi \left(\frac{\cos \alpha}{\lambda} \xi' + \frac{\cos \beta}{\lambda} \eta' \right) \right] d\xi' d\eta'$$

Si se encuentra la relación entre $A\left(\frac{\cos \alpha}{\lambda}, \frac{\cos \beta}{\lambda}, 0\right)$ y $A\left(\frac{\cos \alpha}{\lambda}, \frac{\cos \beta}{\lambda}, d\right)$, entonces los efectos de la propagación de la onda sobre el espectro angular de la perturbación serán evidentes, y podremos encontrar $\Psi(\xi', \eta')$.

Puede demostrarse [Goo68], que la relación existe y está dada por:

$$\begin{aligned} A\left(\frac{\cos \alpha}{\lambda}, \frac{\cos \beta}{\lambda}, d\right) &= A_0\left(\frac{\cos \alpha}{\lambda}, \frac{\cos \beta}{\lambda}, 0\right) \exp\left[i\frac{2\pi}{\lambda} \cos \gamma d\right] \\ &= A_0\left(\frac{\cos \alpha}{\lambda}, \frac{\cos \beta}{\lambda}, 0\right) \exp\left(i\frac{2\pi}{\lambda} \sqrt{1 - (\cos^2 \alpha + \cos^2 \beta)} d\right) \end{aligned} \quad (2.35)$$

siempre que se cumpla: $\cos^2 \alpha + \cos^2 \beta < 1$.

En consecuencia, bajo estas condiciones, de la Ecuación 2.35 se advierte que el efecto de propagar el campo una distancia d implica un mero cambio en las fases relativas de las distintas componentes del espectro angular. Puesto que cada onda plana componente se propaga a un ángulo en particular, cada una viaja una distancia diferente para alcanzar un punto de observación fijo, introduciéndose así un retardo en fase.

Finalmente, la perturbación que se observa en cualquier plano perpendicular al eje a una distancia de propagación d puede escribirse en términos del espectro angular inicial sustituyendo la Ecuación 2.35 en la Ecuación 2.34:

$$\begin{aligned} \Psi(\xi', \eta') &= \iint_{-\infty}^{\infty} A_0\left(\frac{\cos \alpha}{\lambda}, \frac{\cos \beta}{\lambda}, 0\right) \exp\left[i\frac{2\pi}{\lambda} \cos \gamma d\right] \dots \\ &\quad \exp\left[i2\pi\left(\frac{\cos \alpha}{\lambda} \xi' + \frac{\cos \beta}{\lambda} \eta'\right)\right] d\frac{\cos \alpha}{\lambda} d\frac{\cos \beta}{\lambda} \end{aligned}$$

o

$$\begin{aligned} \Psi(\xi', \eta') &= \Im\left(A_0\left(\frac{\cos \alpha}{\lambda}, \frac{\cos \beta}{\lambda}, 0\right) \exp\left[i\frac{2\pi}{\lambda} (\cos \gamma) d\right]\right) \\ &= \Im\left(\Im(U(x, y)) \exp\left[i\frac{2\pi}{\lambda} \sqrt{1 - (\cos^2 \alpha + \cos^2 \beta)} d\right]\right) \end{aligned} \quad (2.36)$$

2.3.2.1. Efectos de una apertura difractante en el espectro angular del campo

En virtud de lo expuesto en la sección anterior, particularicemos ahora para el caso en que la perturbación óptica es difractada por una apertura. Supongamos que un campo complejo U incide sobre una pantalla opaca en el plano xy ($z = 0$), que contiene una apertura difractante Σ . Si ésta se encuentra caracterizada por una función de transmitancia de amplitud dada por $t(x, y)$, entonces, inmediatamente detrás de la apertura ($z = 0^+$) el campo queda determinado por la ecuación:

$$U_o(x, y) = U(x, y, 0) = t(x, y) U_i(x, y, 0)$$

El espectro angular del campo transmitido inmediatamente por detrás de la apertura es simplemente:

$$A_t \left(\frac{\cos \alpha}{\lambda}, \frac{\cos \beta}{\lambda}, 0 \right) = \mathfrak{S}(U_o(x, y)) = \mathfrak{S}(U_i(x, y) \cdot t(x, y)) \quad (2.37)$$

Ahora bien, para conocer el espectro angular del campo que fue difractado en el plano $z = 0$ en cualquier otro plano a una distancia d , perpendicular a la dirección de propagación, basta con reemplazar la Ecuación 2.37 en la Ecuación 2.35, teniendo en cuenta que, en este caso, $A_t \left(\frac{\cos \alpha}{\lambda}, \frac{\cos \beta}{\lambda} \right)$ hace las veces de $A_0 \left(\frac{\cos \alpha}{\lambda}, \frac{\cos \beta}{\lambda} \right)$. Así, se tiene:

$$\begin{aligned} A \left(\frac{\cos \alpha}{\lambda}, \frac{\cos \beta}{\lambda}, d \right) &= A_t \left(\frac{\cos \alpha}{\lambda}, \frac{\cos \beta}{\lambda}, 0 \right) \exp \left[i \frac{2\pi}{\lambda} (\cos \gamma) d \right] \\ &= \mathfrak{S}(U_i(x, y) \cdot t(x, y)) \exp \left[i \frac{2\pi}{\lambda} \sqrt{1 - (\cos^2 \alpha + \cos^2 \beta)} d \right] \end{aligned}$$

Finalmente el campo óptico en ese plano queda determinado por la Ecuación 2.36:

$$\Psi(\xi', \eta') = \mathfrak{S} \left(\mathfrak{S}(U_i(x, y) \cdot t(x, y)) \exp \left[i \frac{2\pi}{\lambda} \sqrt{1 - (\cos^2 \alpha + \cos^2 \beta)} d \right] \right) \quad (2.38)$$

Para resumir, la introducción de una apertura difractante limita espacialmente la onda incidente y el efecto que ocasiona consiste en un ensanchamiento del espectro angular de la perturbación. Mientras más estrecha es la apertura, mayor el esparcimiento del espectro angular detrás de la apertura.

3. Fundamentos Teóricos II

El estudio de objetos microscópicos de diverso tipo, tanto microestructuras como microespecímenes biológicos ha sido objeto de interés para la comunidad científica por mucho tiempo. La importancia de este campo de estudio desde la Biología, desde la Microbiología, la Medicina y la Industria, por citar algunos ejemplos, demanda de técnicas cada vez más eficaces y versátiles.

Tradicionalmente, el estudio de objetos microscópicos se ha llevado a cabo bajo el microscopio óptico compuesto, que se sirve de la luz visible para crear una imagen aumentada del objeto (incluso por encima de las 2.000 veces su tamaño real). El microscopio compuesto es un arreglo de lentes; básicamente, compuesto por dos lentes delgadas convergentes: el objetivo (de distancia focal muy corta) y el ocular, ambos montados en extremos opuestos de un tubo cerrado. La imagen del espécimen formada por el objetivo se usa como objeto para el ocular. Cuando ambos elementos se arreglan de forma adecuada, se obtiene un aumento mayor que el que podemos obtener con una lupa simple, lográndose así la visualización de objetos microscópicos. Este tipo de microscopio es altamente útil para el estudio de una vasta variedad de microespecímenes; no obstante, tiene un alcance limitado, dado que un objeto microscópico no será visible con este arreglo, a menos que posea cierto grado de contraste con el medio en el que está inmerso. Esto es, sólo *objetos de amplitud* que ocasionan variaciones en la amplitud de la onda que reflejan o transmiten serán visibles con esta configuración.

Sin embargo, muchos especímenes biológicos, tales como células y sus componentes intracelulares, son transparentes por lo que exhiben un bajo contraste en amplitud; son esencialmente *objetos de fase*, cuyo espesor óptico varía de un punto a otro, conforme el índice de refracción y/o espesor efectivo varían, alterando solamente la fase de la onda que los atraviesa. Esta característica los torna difíciles de distinguir de sus alrededores mediante microscopía convencional, pues el ojo, como cualquier medio fotosensible, es incapaz de detectar variaciones de fase.

Existen distintas variantes de la técnica microscópica, que son más o menos útiles según los objetos que se deseen estudiar. En algunos casos, se opta por teñir las muestras de modo que exhiban un contraste diferencial del objeto de estudio respecto del medio. De hecho, el método Golgi, un método de tinción propuesto por Camillo Golgi, fue un descubrimiento fundamental en el campo de la anatomía nerviosa. El trabajo en la estructura del sistema nervioso mediante este método le valieron tanto a Golgi como a Santiago Ramón y Cajal el Premio Nobel en Fisiología o Medicina en 1906. A pesar de sus alcances, en ocasiones, el proceso de tinción puede dañar

la muestra y alterar así el estudio de un proceso biológico vital. Como contraparte, existen técnicas alternativas [Zer42a, Zer42b, MYLK05, MYK06] que mejoran la visibilidad de estos especímenes sin alterarlos química o físicamente. Entre ellas, se distingue la Microscopía de Contraste de Fase de Zernike (técnica por la cual Frits Zernike recibió el premio Nobel en Física en 1953), la de Nomarski y la de Campo Oscuro, que constituyen herramientas invaluable para el estudio detallado de células vivas e incluso para la comprensión de procesos celulares, cumpliendo un importante papel en la biología moderna y en medicina. En las dos primeras, el principio subyacente consiste en sacar ventaja de las variaciones de fase que introduce el espécimen bajo estudio en la luz que lo atraviesa; la información de las variaciones de índice de refracción de la muestra y, por ende, las características estructurales de la muestra son características que implícitamente permiten la visualización del objeto. El índice de refracción resulta así un poderoso agente de contraste endógeno para la estructura celular. Las variaciones de fase son convertidas en variaciones de intensidad y los objetos se tornan visibles. Cabe destacar, sin embargo, que la relación entre la intensidad y la fase generalmente no es lineal, por lo que ambas técnicas son de naturaleza cualitativa y su uso se limita a observaciones morfológicas sin posibilidad de tener acceso a datos cuantitativos [PPL⁺08].

La Microscopía Holográfica Digital (MHD)[CMD99], por su parte, es una técnica que ha recibido un interés sustancial en los últimos años dado que permite recuperar la información *cuantitativa* de la fase de la luz que emana de la muestra y, como consecuencia, obtener información estructural y dinámica. La información de fase puede traducirse a información de variaciones locales de índice de refracción o de espesor de la muestra. Todo esto le confiere a la técnica un atractivo particular, la misma se ve potenciada por la ventaja adicional de que las muestras bajo estudio no requieren de preparación especial ni de agentes de contraste externo; éstas son iluminadas con luz láser, habitualmente en la región visible o infraroja. Adicionalmente, en la literatura abundan metodologías para la corrección numérica o física de aberraciones producto del registro y, dada su naturaleza, la técnica ofrece la posibilidad de enfocar numéricamente en múltiples planos a partir de un solo holograma, emulando el escaneo mecánico del foco característico de la microscopía convencional.

La MHD tiene sus cimientos en la Holografía, técnica de formación de imágenes sin lentes, que aprovecha las alteraciones de fase que sufre la luz de una fuente coherente cuando se refleja o atraviesa un objeto, almacenándola mediante una configuración interferométrica. Gracias a su naturaleza interferométrica, las imágenes de fase que se obtienen mediante MHD proveen información detallada sobre la superficie del espécimen en configuración por reflexión, o de su estructura interna en configuración por transmisión. Esencialmente, la luz que emana del objeto, comúnmente denominada *onda objeto*, se hace interferir en un medio de registro fotosensible con una onda de luz que no lo atraviesa y que se denomina *onda de referencia* y constituyen lo que se denomina *holograma*. Su esencia, en lo que hace a los aspectos prácticos se resume en dos etapas:

- La etapa de registro de la información del objeto que se desea estudiar, me-

diante el registro de la amplitud y la fase de la onda que lo atraviesa o se refleja en el sensor de una cámara digital

- La etapa de reconstrucción numérica o recuperación de la información, a partir de las bases teóricas dadas por la Teoría escalar de la Difracción, cuyos resultados más importantes fueron expuestos en el capítulo precedente (Capítulo 2)

El presente capítulo está dedicado al estudio de las bases de la MHD, iniciándose con el marco teórico de la Holografía como técnica madre, para particularizar luego la configuración experimental para MHD. Se exponen además las consideraciones prácticas para el registro y reconstrucción de los hologramas.

3.1. Holografía convencional

Luego de la primera publicación de esta técnica realizada por Denis Gabor en 1948, se han realizado numerosos estudios en el campo de la holografía convencional o clásica. Los trabajos iniciados por D. Gabor [Gab48], E.N. Leith [LU63, LU64, LS82], A. Lohmann [Loh65], J. Upatnieks [ULL66], R.F. Vanligte [VO66], J.W. Goodman [Goo68], aún tienen gran impacto en las investigaciones actuales de holografía. Una revisión histórica y de los resultados pueden encontrarse en [Goo68], [C.79] y [Lei97]. En la siguiente sección sólo se darán los basamentos necesarios para el estudio e implementación de la MHD.

3.1.1. Proceso de Registro

La palabra holografía significa literalmente que *toda* la información se registra, esto es tanto la amplitud como la fase. La palabra proviene del griego y significa *registro del todo*, *holos* (todo) y *graphein* (dibujo, registro). Frente a la fotografía, que es la técnica más conocida para formar imagen, la holografía presenta la particularidad de lograr este cometido sin requerir de un sistema de enfoque.

Ahora bien, puesto que la frecuencia de la luz es de aproximadamente 10^{15} Hz los detectores ordinarios, tales como películas fotográficas, fotodiodos, o la retina de un ojo, son incapaces de responder a variaciones tan rápidas, y, en vez de ello, responden a la intensidad I , definida como el promedio temporal del flujo de energía de la onda de luz ($I \propto \langle E^2 \rangle$ o $I \propto |E^2|$). Como consecuencia, cuando se desea registrar la información de fase de una onda, ésta debe convertirse convenientemente en variaciones de intensidad. El fin se alcanza mediante un arreglo interferométrico, es decir, haciendo superponer dos o más ondas en una región específica del espacio.

En Holografía, el proceso de adquisición consiste en registrar en un medio fotosensible la interferencia entre *dos* ondas coherentes: una primera onda que emana del objeto llamada *onda objeto* E_O , y una segunda onda que no interactúa con el objeto denominada *onda de referencia* E_R . La distribución de intensidad resultante

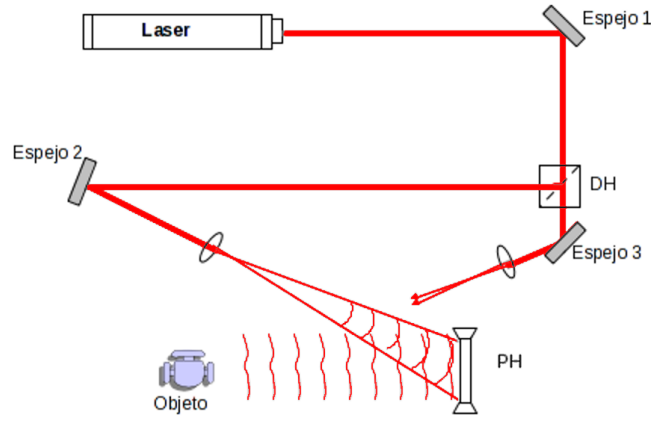


Figura 3.1.: Esquema de un dispositivo óptico para registrar un holograma.

depende de la amplitud y la fase del frente de onda del objeto original. Dos ondas de luz que son capaces de interferir unas con otras se dicen *coherentes*. Debido a los requerimientos de coherencia es que la mayoría de los experimentos de interferencia se llevan a cabo usando dos imágenes de la misma fuente física. Estas imágenes se producen por un instrumento llamado *interferómetro*. En general, las dos ondas dentro del instrumento viajan por caminos separados y se recombinan a la salida donde interfieren formando un patrón de franjas. Si se interpone un objeto en uno de los haces, se altera la diferencia de *LCO* y cambia, por lo tanto, la distribución de franjas.

Un montaje experimental típico se muestra en la Figura 3.1[SJ05]. Un haz de luz coherente, proveniente de un láser, se divide en dos ondas por medio de un divisor de haz (DH). Una de ellas, la onda objeto, ilumina el objeto, siendo dispersada por la superficie del mismo (en todas las direcciones) y llegando parte de ella al medio de registro. La otra, la onda de referencia, ilumina directamente el medio de registro. Ambas interfieren allí, grabando un complejo patrón de franjas microscópicas portadoras de la información completa del frente de onda objeto. En holografía clásica el medio de registro usualmente es alguna emulsión fotográfica depositada en una placa de vidrio o acetato.

Desde un punto de vista matemático, y prescindiendo del carácter vectorial, tal como se ha hecho hasta aquí, en el plano del holograma xy , sobre el cual se encuentra la superficie plana de una placa holográfica, incide una onda objeto de amplitud compleja:

$$E_O(x, y) = O(x, y) \exp[i\phi_o(x, y)]$$

y una onda de referencia descrita por:

$$E_R(x, y) = R(x, y) \exp[i\phi_R(x, y)]$$

Estas ondas interfieren en el espacio, y particularmente la placa capta una porción de la interferencia cuya intensidad resultante es:

$$\begin{aligned} I_H(x, y) &= |E_O(x, y) + E_R(x, y)|^2 = (E_O(x, y) + E_R(x, y)) (E_O(x, y) + E_R(x, y))^* \\ &= |E_O|^2 + |E_R|^2 + E_R^* E_O + E_R E_O^* \\ &= |O|^2 + |R|^2 + 2OR \cdot \cos[\phi_R(x, y) - \phi_O(x, y)] \end{aligned} \quad (3.1)$$

donde $|R|^2$ es la intensidad de la onda de referencia y $|O|^2$ la intensidad de la onda objeto, E_R^* y E_O^* denotan los complejos conjugados de las dos ondas. Los dos primeros términos dependen sólo de la intensidad de cada una de las ondas, mientras que el tercero depende de la diferencia de fase entre las ondas. Este registro interferométrico es lo que se denomina holograma.

En cuanto a las características del medio de registro, se supone que el mismo transforma linealmente la intensidad, durante la exposición, en amplitud de transmitancia después del revelado [Goo68]. Por lo tanto, las variaciones de exposición permanecen en la región lineal de la curva Transmitancia vs. Exposición ($h - E$) del film utilizado. La amplitud de transmisión $h(x, y)$ de la placa revelada resulta proporcional a la intensidad y viene dada por la ecuación:

$$h(x, y) = h_O + \beta\tau I(x, y) \quad (3.2)$$

Donde β es la pendiente característica de la curva $h - E$, τ es el tiempo de exposición y h_O es la transmisión en amplitud de una placa no expuesta.

3.1.2. Proceso de reconstrucción

Para recuperar el frente de onda objeto E_O , el holograma revelado se ilumina con una onda coherente. Si se asume una onda U con una intensidad uniforme, y se supone además que la transmitancia del holograma es proporcional a la exposición, como suele ocurrir con las placas holográficas, según la Ecuación 3.2 y la Ecuación 2.18 la amplitud transmitida por la transparencia queda expresada como sigue:

$$\begin{aligned} U(x, y) h(x, y) &= \left(h_O + \beta\tau (R^2 + O^2) \right) U(x, y) + \beta\tau E_R^*(x, y) E_O(x, y) U(x, y) \\ &\quad + \beta\tau E_R(x, y) E_O^*(x, y) U(x, y) \end{aligned} \quad (3.3)$$

El primer término representa la onda no difractada que atraviesa el holograma y constituye el orden cero de difracción; el segundo y tercer término son generados por los términos de interferencia y generan dos imágenes conjugadas o imágenes gemelas del objeto. $E_R^* E_O U$ produce una imagen virtual ubicada en la posición inicial del objeto y $E_R E_O^* U$ produce una imagen real ubicada al otro lado del holograma.

Si la reconstrucción se lleva a cabo iluminando el holograma con una réplica de la onda de referencia con la que se construyó el holograma- esto es, $U = E_R$ - la

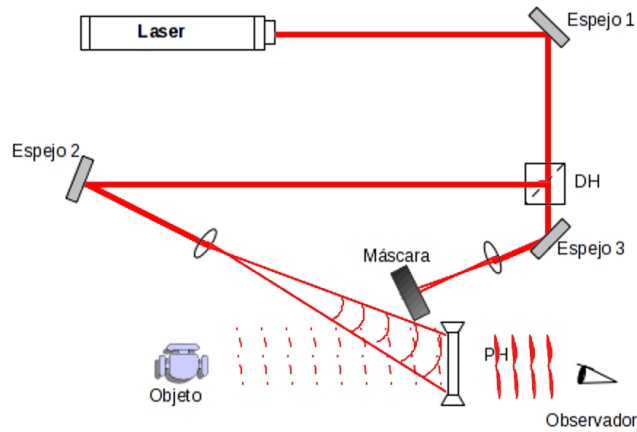


Figura 3.2.: Dispositivo experimental para reconstruir un holograma

imagen virtual resulta $|R|^2 E_O$, una réplica exacta de la onda objeto; el factor que la multiplica es la intensidad de la onda de referencia y sólo modifica el brillo de la imagen. El tercer término resulta una imagen real distorsionada del objeto; la razón de la distorsión es la presencia del factor complejo de variación espacial E_R^2 , el cual modula la onda objeto conjugada E_O^* . Recíprocamente, si $U = E_R^*$, la imagen real resulta $|R|^2 E_O^*$, una réplica de la onda objeto conjugada multiplicada por la intensidad de la onda de referencia. El primer caso se ilustra en la Figura 3.2. Un observador, mirando a través de la placa, ve una imagen virtual, que es indistinguible del objeto original, y que se encuentra a la misma distancia d de la transparencia que el objeto original. La imagen reconstruida exhibe todos los efectos de perspectiva y profundidad de foco. Si el observador cambia de posición de observación, observa otra perspectiva del objeto, tal como ocurre con un objeto verdadero.

Una característica distintiva del holograma es que si se lo fragmenta en varios pedazos, cada uno de ellos posee toda la información del frente de onda. Sin embargo, como ocurre con una ventana desde la cual se ve un paisaje donde el campo visual está limitado por la extensión de la ventana, la extensión de la escena depende del tamaño del fragmento. Análogamente, así como las distintas ubicaciones de la ventana frente al paisaje dan distintas perspectivas del mismo, los distintos fragmentos tienen información de las distintas perspectivas.

Por último, cabe destacar que la condición $U = E_R$ o $U = E_R^*$ puede no satisfacerse estrictamente. En tal caso, si se ilumina con una onda de otra longitud de onda u otra estructura espacial se verá afectada la calidad de las imágenes reconstruidas, exhibiéndose ciertas distorsiones o desmejorando la resolución de las mismas.

3.1.3. Tipos de hologramas

Existen numerosos tipos de hologramas. Básicamente difieren unos de otros por el arreglo experimental utilizado en su construcción; esto es, por la forma en la que las

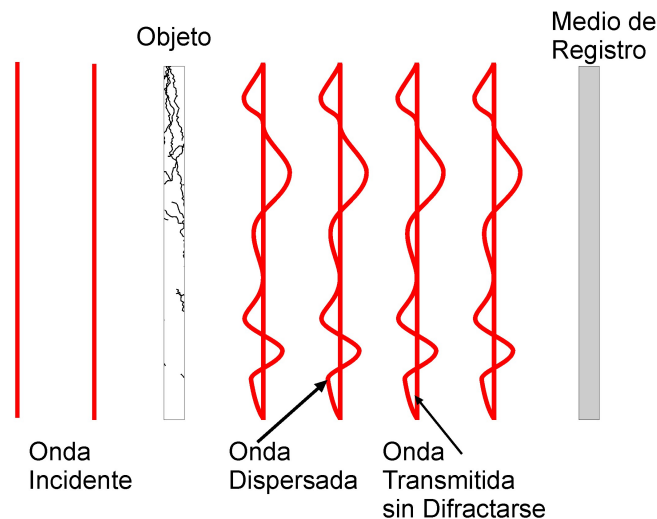


Figura 3.3.: Modo de registro de un holograma de GABOR.

ondas objeto y referencia interfieren.

Holograma en línea

En el trabajo original de Gabor, el registro del holograma se presenta en una geometría *en línea* y se denomina holograma de transmisión en línea. En este caso, el haz objeto y el haz de referencia tienen direcciones de propagación paralelas (Figura 3.3). Para ello, un único haz actúa simultáneamente como haz de referencia y como haz objeto. Esta configuración es útil cuando se desea obtener un holograma de un objeto transparente. Este, al ser iluminado, modifica la estructura de la luz difractándola. La parte de la onda que atraviesa la transparencia sin difractarse es la onda de referencia. Luego, ambas ondas (la difractada y la de referencia) interfieren en el medio de registro.

Para la reconstrucción, el holograma revelado es iluminado por la misma onda de referencia. Como resultado, se reconstruyen en la misma línea la imagen real delante del holograma, y la virtual detrás del holograma (exactamente donde el objeto se encontraba originalmente) ambas superpuestas con la onda de referencia. El inconveniente de este arreglo es que las tres ondas difractadas se superponen, de modo que los tres términos de la Ecuación 3.3 se propagan en la misma dirección y no pueden observarse de manera separada, tal como se muestra en la Figura 3.4. El resultado es una imagen ruidosa y de bajo contraste.

Holograma fuera de eje

En 1962, LIETH y UPATNIEKS [LU62] sugirieron una configuración alternativa denominada holografía fuera de eje, cuyo esquema permite separar espacial y angu-

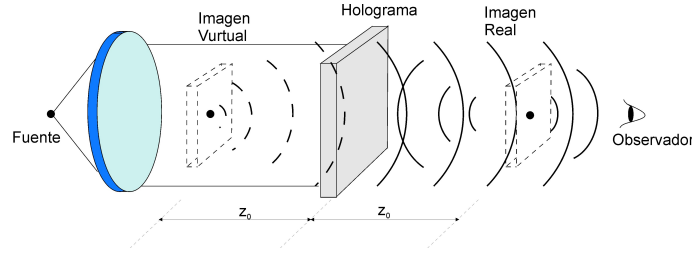


Figura 3.4.: Reconstrucción del holograma de GABOR – Formación de las imágenes gemelas

larmente las tres ondas difractadas en el proceso de reconstrucción, dadas por la Ecuación 3.3. La onda de referencia usada en la construcción del holograma se propaga en una dirección angular θ diferente de la onda objeto, tal como se ilustró en la Figura 3.1.

El proceso de registro y reconstrucción para esta configuración se encuentran esquematizados en las Figura 3.1 y Figura 3.2. Si se considera una onda plana de referencia

$$E_R(x, y) = R \exp(ikx \sin \theta) \quad (3.4)$$

con $k = 2\pi/\lambda$ el número de onda, la distribución de intensidad registrada sobre el plano del holograma resulta:

$$I_H = I_R + I_O + \sqrt{I_R} \exp(-ikx \sin \theta) E_O + \sqrt{I_R} \exp(ikx \sin \theta) E_O^* \quad (3.5)$$

donde $I_R = |R|^2$ y $I_O = |O|^2$, el tercer término es el asociado a la imagen virtual; su factor de fase $\exp(-ikx \sin \theta)$ indica que la onda es deflectada un ángulo $-\theta$ con respecto a la dirección de la onda de iluminación E_R . El factor de fase del cuarto término, indica que la onda que genera la imagen real se deflecta con un ángulo θ . El orden cero de difracción se propaga en la misma dirección que E_R . Claramente, la geometría fuera de eje separa espacialmente los órdenes de difracción, lo que permite la observación individual de cada término.

El procedimiento otorga la libertad de hacer interferir ambas ondas bajo ángulos relativamente grandes, lo que facilita el montaje experimental. Mientras mayor sea el ángulo entre los haces, menor será la distancia interfranja del interferograma, con lo cual los órdenes de difracción aparecerán más separados. Sin embargo, los órdenes sólo podrán separarse hasta cierto límite, impuesto por la resolución de la emulsión fotográfica que debe resolver las franjas de interferencia que forman el holograma. Las placas holográficas usuales resuelven hasta 5000 líneas por milímetro. A modo de comparación, digamos que una emulsión para fotografía común tiene una resolución del orden de 100 líneas/mm. En este sentido, la holografía digital, que usa el sensor de una cámara digital como medio de registro impone condiciones más restrictivas.

3.2. Holografía Digital

Un análisis detallado sobre holografía digital puede encontrarse en [SW05]. Esencialmente la Holografía Digital (HD, en lo sucesivo) supone el registro de un holograma mediante un montaje óptico interferométrico, similar a los explicados anteriormente. La principal diferencia reside en el reemplazo del medio de registro del holograma por una cámara electrónica o digital, tales como una cámara CCD (Charged Coupled Device) o CMOS (Complementary Metal-oxide Semiconductor), y en la posterior reconstrucción mediante un sistema de cómputo numérico. Un sensor CCD o CMOS consiste en una matriz de detectores semiconductores de luz integrados en un chip. Cuando los fotones inciden sobre cada uno de ellos, se genera, por efecto fotoeléctrico, una corriente de electrones que es proporcional a la intensidad de luz incidente. Ésta se dirige hacia una celda de memoria donde es interpretada dentro de un rango de valores discretos en niveles de gris. Cada fotosensor, tiene así asociado un píxel en la imagen.

La idea de reconstruir un holograma con una computadora fue propuesta por primera vez hace más de 40 años en 1967 por GOODMAN y LAWRENCE y por KRONROD *et al.* [GL67, KMY72]. En ese momento, los principales inconvenientes eran la velocidad insuficiente de las computadoras y la falta de dispositivos adecuados para la adquisición digital de la imagen (holograma). Desde 1990, con la invención de los dispositivos CCD, y actualmente los CMOS, numerosas investigaciones a nivel mundial se dirigieron hacia la posibilidad del uso de esta nueva tecnología para reemplazar el soporte de registro de los hologramas [Sch94, CDCH]. Un avance importante en el desarrollo de la técnica se dio cuando se logró recuperar no sólo la amplitud del frente de onda, sino también la fase a partir de un sólo holograma; esto le confirió a la técnica la gran ventaja del acceso a información detallada de la morfología y composición del objeto. Los avances en este tópico fueron hechos por CUCHE *et al.* en 1999 [CBD99] y luego por LIEBLING [Lie04].

La HD trajo consigo numerosas ventajas: no es necesario el procesado químico del medio de registro, las velocidades de adquisición son más elevadas, la adquisición puede realizarse a tiempo real, mientras que la reconstrucción numérica de la onda objeto nos ofrece un acceso *cuantitativo* a las cantidades de interés (intensidad y fase) y grandes posibilidades para manipular imágenes, corregir aberraciones, eliminar parcialmente ruidos mediante técnicas adecuadas de procesamiento de imagen, etc. Por otro lado, en holografía convencional, la relación de intensidad entre los haces objeto y de referencia debe ser por lo menos 3:1 para evitar efectos no lineales del medio de registro. Sin embargo, es bien sabido de la teoría de interferencia que el máximo contraste en un patrón de interferencia se logra cuando la relación de intensidad referencia/objeto es 1:1 [SJ05]. Los CCD tienen una curva de exposición considerablemente lineal y por ende la relación de haces puede ajustarse para alcanzar el óptimo valor.

La HD, al mismo tiempo, impone ciertas restricciones al tamaño de los objetos de los que puede registrarse un holograma, o equivalentemente a la distancia del sensor a

la que éstos pueden ubicarse. Esto tiene relación con la limitada resolución espacial de los sensores electrónicos actuales, lo que a su vez limita el máximo ángulo que pueden formar los haces objeto y referencia. Comparado con las placas holográficas, que usualmente registran hasta 5000 líneas/mm, los CCD típicos disponibles en el mercado resuelven apenas 100 líneas/mm con un tamaño de píxel del orden de los $10\mu m$. Además, las dimensiones físicas de los soportes disponibles son mucho menores que la información que desea almacenarse.

3.2.1. Consideraciones para el registro en HD

La baja resolución que presentan los soportes para HD comparados con los de holografía convencional, deviene en la necesidad de establecer cuidadosamente el criterio de muestreo de la señal. Para establecer las condiciones experimentales óptimas que garanticen una reproducción fidedigna de la información, se recurre al Teorema de muestreo de WITHTAKER-SHANNON .

Asumiendo que el sensor dispone de $N \times N$ fotosensores (chip cuadrado), el holograma digital es una matriz de números de 8 bits que resultan del muestreo bidimensional realizado por el sensor de la señal continua $I_H(x, y)$ en la señal discreta $I_H(j, l)$:

$$I_H(j, l) = I_H(x, y) \text{rect} \left[\frac{x}{L}, \frac{y}{L} \right] \times \sum_{j=-N/2}^{N/2} \sum_{l=-N/2}^{N/2} \delta(x - j\Delta x, y - l\Delta y)$$

Donde j y l son enteros, $L \times L$ es el área sensible del chip, y $\Delta x = L/N$, $\Delta y = L/N$ definen los intervalos de muestreo en el plano del holograma, esto es, el tamaño del píxel.

La teoría de muestreo de señales [Goo68] establece mediante el criterio de SHANNON que la frecuencia de muestreo debe ser al menos el doble de la máxima frecuencia de la señal. En HD, la señal óptica es un patrón de franjas de interferencia que el sensor debe resolver; el período de muestreo de la misma está fijado por el tamaño de los píxeles que conforman el chip de la cámara. Así, el criterio exige que la distancia inter-franja sea, al menos, el doble que el tamaño del píxel; esto da una frecuencia de corte:

$$\nu_{\text{máx}} = \frac{1}{2\Delta x}$$

con Δx el tamaño de píxel.

Se puede demostrar [SJ05] que esta condición se cumple cuando el ángulo θ entre los haces objeto y referencia verifica:

$$\theta \leq \frac{\lambda}{2\Delta x}; \quad \theta_{\text{máx}} \simeq \frac{\lambda}{2\Delta x} \quad (3.6)$$

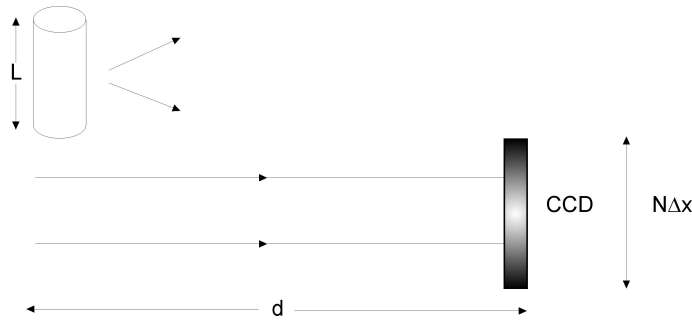


Figura 3.5.: Arreglo experimental

Ahora supongamos que el objeto de interés tiene una longitud L . El objeto puede considerarse compuesto por un número infinito de fuentes puntuales que emanan rayos en todas las direcciones. Para este caso, la condición dada por la Ecuación 3.6, debe satisfacerse para cada uno de los rayos que salen del objeto, en particular, para aquel que emerge de uno de los bordes del objeto y llega al borde opuesto de la CCD, de longitud $N\Delta x$. Esto limita la distancia a la que este objeto puede ubicarse sin violar la condición de la Ecuación 3.6. Para un montaje experimental como el que se muestra en la Figura 3.5, en el cual se asume una onda de referencia plana que se propaga perpendicular al plano del CCD, puede demostrarse [SJ05] que la mínima distancia d_{\min} , a la que puede ubicarse el objeto es:

$$d_{\min} = \sqrt{5} \frac{\Delta x}{\lambda} (L + N\Delta x) \quad (3.7)$$

Alternativamente, si se desea ubicar el objeto a cualquier otra distancia del CCD, el tamaño de éste queda limitado, con un valor máximo permitido:

$$L_{\max} = \frac{\lambda}{\Delta x \sqrt{5}} d - N\Delta x$$

Si se trabaja con un láser de He-Ne de $632,8nm$ y con una CCD con 512 píxeles de $8,4\mu m$, de la Ecuación 3.6 y la Ecuación 3.7 se tiene que el ángulo máximo permitido entre el haz objeto y el de referencia es de 2.15° , en tanto que para un objeto de 10 cm se requiere una distancia mínima de 3 metros. Por lo expuesto, se advierte que tales condiciones drásticas de trabajo pueden mejorarse si se disponen de sensores con píxeles más chicos, característica de los sensores CMOS. Sin embargo, la reducción del tamaño de los píxeles enfrenta dos problemas [JST01]: el primero, tecnológico, tiene que ver con las posibilidades de diseñar componentes microelectrónicos más pequeños; el segundo tiene que ver con consideraciones ópticas y de procesamiento de imágenes. La superficie que abarca un píxel en un sensor es un área de integración y una reducción de la misma implica una disminución de los electrones fotogenerados. Desde un punto de vista señal-ruido, la transferencia de carga que se efectúa durante la lectura introduce un ruido electrónico significativo, sobre todo para los sensores

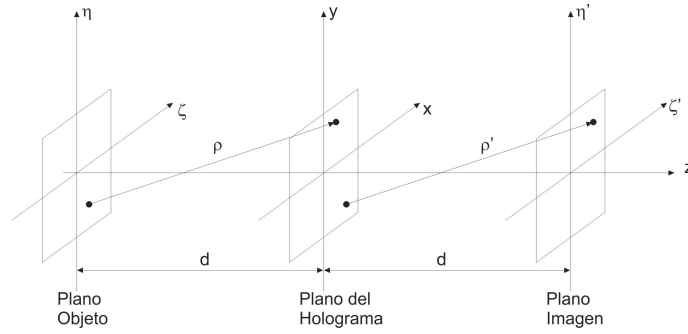


Figura 3.6.: Sistema coordenado para la reconstrucción numérica.

CCD. Luego, se requieren de grandes cantidades de electrones fotogenerados para ser detectados adecuadamente, por cuanto la reducción permitida del tamaño de píxel es muy pequeña.

3.2.2. Proceso de reconstrucción numérica

Una vez que el holograma fue capturado, se encuentra codificado numéricamente como una imagen digital. Cucho *et al.* mostraron en 1999 [CBD99] que la reconstrucción numérica del frente de onda completo puede alcanzarse «imitando» a nivel numérico la difracción que naturalmente experimenta la onda de referencia al atravesar el holograma en holografía convencional (que se comporta como la apertura difractante Σ). En este cometido, introdujeron el concepto de haz de referencia digital, que simula el rol que tiene el haz de referencia en la reconstrucción holográfica convencional.

Particularmente, al traducir estos formalismos al contexto de la HD, nos remitimos a los fundamentos teóricos presentados en la Sección 2.3 que describen el comportamiento de una perturbación óptica mientras se propaga en el espacio y cuando atraviesa una apertura difractante. En este caso, y refiriéndonos a la Ecuación 2.18 la función holograma asume el papel de la función de transmitancia, y se ubica en el plano del sensor CCD/CMOS, esto es $t(x, y) \equiv h(x, y) = I_H(x, y)$ (en este caso, suponemos que los sensores responden linealmente a la intensidad, por lo que a menos de un factor multiplicativo la suposición $h(x, y) = I_H(x, y)$ es válida). Por su parte, la perturbación óptica que ilumina la apertura es el haz de referencia, es decir $U_i(x, y) \equiv E_R(x, y)$, mientras que la perturbación óptica que surge justo detrás de la apertura es según la Ecuación 2.18 $U_o(x, y) = t(x, y)U_i(x, y) = I_H(x, y)E_R(x, y)$.

En la Figura 3.6 se ilustra el sistema coordenado para la reconstrucción numérica del holograma.

De acuerdo al formalismo descrito en la Sección 2.3, $U_o(x, y)$ debe propagarse según lo indica la Teoría escalar de la Difracción una distancia d hacia atrás hasta el plano $\xi\eta$ para reconstruir la imagen virtual, y una distancia d hacia adelante hasta el

plano $\xi'\eta'$ para reconstruir la imagen real o gemela. El frente de onda reconstruido consiste en una distribución bidimensional de números complejos Ψ , a partir de la cual pueden calcularse tanto intensidad como fase.

A la luz de lo expuesto en la sección previa, Subsección 3.2.1, el procedimiento requiere de la discretización de las señales. En virtud de esto, en HD la función holograma $I_H(j, l)$ representa una distribución bidimensional de intensidades de luz en el plano del holograma xy en el que se encuentra el sensor. Consiste en una matriz cuadrada de $N \times N$ números reales, muestreados cada Δx y Δy a lo largo de las coordenadas x e y . $E_R(j, l)$ es la versión discretizada de $E_R(x, y)$. Del mismo modo, $\Psi(m, n, d)$ o $\Psi(m, n, -d)$, es el frente de onda que reconstruye la imagen real y virtual respectivamente y representa una matriz de números complejos portadora de toda la información óptica inherente a la onda Objeto. Los subíndices m, n indican el «recorrido» discreto a lo largo de los planos $\xi\eta$ y $\xi'\eta'$.

La reconstrucción numérica de los hologramas puede realizarse mediante la descripción de Fresnel, empleando el formalismo de la convolución o propagando el espectro angular. Cualquiera sea la forma empleada para calcular la integral de superposición que resulta en Ψ , la información completa de la onda objeto puede recuperarse, tanto en intensidad como en fase. En el marco de la HD, esta información puede desacoplarse en dos imágenes digitales: una imagen de contraste de amplitud y una imagen de contraste de fase. Estas se calculan mediante las expresiones dadas por la Ecuación 2.23 y la Ecuación 2.24 cuyas formas discretizadas son:

$$\begin{aligned} I(m, n, d) &= |\Psi(m, n, d)|^2 \\ \phi(m, n, d) &= \arctan \left[\frac{\text{Im}[\Psi(m, n, d)]}{\text{Re}[\Psi(m, n, d)]} \right] \end{aligned}$$

3.2.2.1. Reconstrucción mediante la aproximación de Fresnel

Suponiendo, por simplicidad, que el holograma es una matriz cuadrada de $N \times N$, la aproximación de Fresnel dada por la Ecuación 2.27, en su versión discretizada para su evaluación numérica resulta:

$$\begin{aligned} \Psi(m, n, d) &= \frac{i}{\lambda d} \exp \left[-i \frac{2\pi}{\lambda} d \right] \exp \left[-i\pi\lambda d (m^2 \Delta v^2 + n^2 \Delta \mu^2) \right] \dots \\ &\quad \times \text{DFT} \left\{ I_H(j, l) E_R(j, l) \exp \left(-i \frac{\pi}{\lambda d} (j^2 \Delta x^2 + l^2 \Delta y^2) \right) \right\}_{m,n} \end{aligned} \quad (3.8)$$

para $m = 0, 1, \dots, N-1$; $n = 0, 1, \dots, N-1$ y donde con DFT se simboliza el algoritmo de la Transformada Discreta de Fourier.

De acuerdo a la teoría de la transformada de Fourier existe una relación entre las escalas en el espacio directo y las del espacio de frecuencias. En este caso la relación entre $\Delta x, \Delta y$ y $\Delta \nu, \Delta \mu$ queda:

$$\Delta \nu = \frac{1}{N \Delta x}; \quad \Delta \mu = \frac{1}{N \Delta y} \quad (3.9)$$

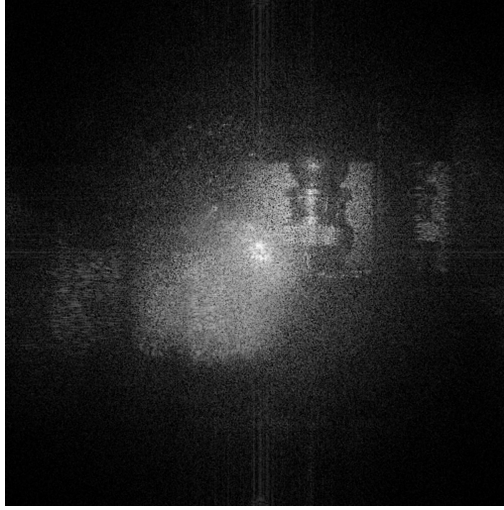


Figura 3.7.: Imagen de amplitud de Holograma Digital. Extraído de [Álv06] (realizado en GOL)

Pero en virtud de las relaciones (Ecuación 2.26), se tiene:

$$\Delta\xi' = \frac{\lambda d}{N\Delta x}; \quad \Delta\eta' = \frac{\lambda d}{N\Delta y} \quad (3.10)$$

De estas relaciones, se advierte que la resolución de las imágenes reconstruidas por la fórmula de difracción de Fresnel, en el plano $\xi'\eta'$, es una función de la distancia de reconstrucción.

A modo de ejemplo en la Figura 3.7 se muestra el holograma digital de un peón de ajedrez registrado y reconstruido por el método de Fresnel en el Laboratorio del GOL.

3.2.2.2. Reconstrucción por el método de la convolución de Huygens

En este caso, el frente de onda reconstruido (a una distancia d) puede escribirse:

$$\begin{aligned} \Psi(\xi', \eta') &= \mathfrak{S}^{-1} \mathfrak{S} \left(\int_{-\infty}^{\infty} \int_{-\infty}^{\infty} I_H(x, y) E_R(x, y) g(\xi', \eta', x, y) dx \cdot dy \right) \\ &= \mathfrak{S}^{-1} (\mathfrak{S}(I_H \cdot E_R) \mathfrak{S}(g)) \end{aligned}$$

Con $g(\xi', \eta', x, y)$ la función de respuesta impulsiva, dada por la Ecuación 2.29.

En este proceso, se necesitan tres Transformadas Discretas de Fourier; en la práctica, cada una de ellas puede efectuarse usando el algoritmo de la FFT.

Puede demostrarse que la forma discreta de la respuesta impulsiva es:

$$g(j, l) = \frac{i}{\lambda} \frac{\exp \left[-i \frac{2\pi}{\lambda} \sqrt{d^2 + \left(j - \frac{N}{2}\right)^2 \Delta x^2 + \left(l - \frac{N}{2}\right)^2 \Delta y^2} \right]}{\sqrt{d^2 + \left(j - \frac{N}{2}\right)^2 \Delta x^2 + \left(l - \frac{N}{2}\right)^2 \Delta y^2}} \quad (3.11)$$

El corrimiento en las coordenadas en $\frac{N}{2}$ es sólo por razones de simetría.

Por su parte, la transformada de Fourier de g , también conocida como Función de transferencia G , es fácilmente calculable. El resultado convenientemente discretizado es:

$$\begin{aligned} \mathfrak{F}(g) &= G(p, q) \\ &= \exp \left[-i \frac{2\pi}{\lambda} \sqrt{1 - \frac{\lambda^2 \left(p + \frac{N^2 \Delta x^2}{2d\lambda}\right)^2}{N^2 \Delta x^2} - \frac{\lambda^2 \left(q + \frac{N^2 \Delta y^2}{2d\lambda}\right)^2}{N^2 \Delta y^2}} \right] \end{aligned} \quad (3.12)$$

Con esto, se optimiza una transformada de Fourier para la reconstrucción:

$$\Psi(m, n, d) = \text{DFT}^{-1} \{ \text{DFT} \{ I_H(j, l) \cdot E_R(j, l) \} G(p, q) \} \quad (3.13)$$

La ventaja que surge en este tratamiento es que la distancia entre píxeles de las imágenes reconstruidas es igual a la que existe en el holograma.

$$\begin{aligned} \Delta \xi &= \Delta x \\ \Delta \eta &= \Delta y \end{aligned}$$

En principio, pareciera posible alcanzar una mayor resolución con este último método; sin embargo la resolución que se calcula mediante Ecuación 3.9, es sólo un valor numérico; la resolución física real de la imagen, en ambos métodos, es la determinada por el límite de difracción. Es decir la Ecuación 3.10 describe el límite en resolución también para este método.

3.2.2.3. Método de la Propagación del Espectro Angular

De los resultados de la Subsubsección 2.3.2.1, la propagación del espectro angular queda sintetizada en la expresión dada por la Ecuación 2.38.

Para discretizar esta expresión, basta hacer algunas consideraciones. En primer lugar, la escala en el plano de reconstrucción es la misma que en el plano del holograma;

esto es $\Delta\xi' = \Delta x$ y $\Delta\eta' = \Delta y$. Por otro lado, podemos expresar los cosenos directores, $\cos\alpha$ y $\cos\beta$, en función de las frecuencias de Fourier f_x y f_y de acuerdo con la Ecuación 2.33, que reescribimos a continuación:

$$\begin{aligned}\cos\gamma &= \sqrt{1 - \cos^2\alpha + \cos^2\beta} \\ &= \sqrt{1 - (\lambda f_x)^2 - (\lambda f_y)^2}\end{aligned}$$

Esta expresión también debe discretizarse. Para ello, las variables continuas f_x y f_y , se expresan como múltiplos enteros de la escala en el espacio de frecuencias:

$$f_x = p\Delta\nu; \quad f_y = q\Delta\mu$$

De modo que:

$$\cos\gamma = \sqrt{1 - (\lambda p\Delta\nu)^2 - (\lambda q\Delta\mu)^2}$$

Ahora bien, la escala de frecuencias en el espacio de Fourier está relacionada con la escala en el espacio ordinario mediante las relaciones de la Ecuación 3.9. Con esto, el campo complejo reconstruido queda numéricamente expresado por:

$$\Psi(m, n, d) = \text{DFT}^{-1} \left(\begin{array}{c} \text{DFT} \{I_H(j, l) \cdot E_R(j, l)\} \\ \cdot \\ \exp \left[i \frac{2\pi}{\lambda} \sqrt{1 - \left(\left(\lambda \frac{p}{N\Delta x} \right)^2 + \left(\lambda \frac{q}{N\Delta y} \right)^2 \right) d} \right] \end{array} \right)_{m,n} \quad (3.14)$$

Con m, n, j, l, p, q variando desde 0 a $N-1$. A la función exponencial de esta ecuación, en el contexto de este trabajo se la designa como factor de propagación F_p .

El método de la *Propagación del Espectro Angular* tiene la ventaja significativa de que no requiere distancias mínimas de reconstrucción como en el caso del método de FRESNEL. Si bien son necesarias dos transformadas de Fourier, en lugar de una única transformada requerida en el método de FRESNEL, este método permite el filtrado en el dominio de frecuencias de manera directa, que puede usarse para remover el orden cero y alguna de las imágenes gemelas.

3.3. Microscopía Holográfica Digital

3.3.1. Configuraciones experimentales

La introducción de un Objetivo de Microscopio (OM, en lo que sigue) en el montaje experimental para holografía dio luz a la MHD, otorgándole a la holografía nuevos e interesantes campos de aplicación. La MHD implica el registro de un holograma

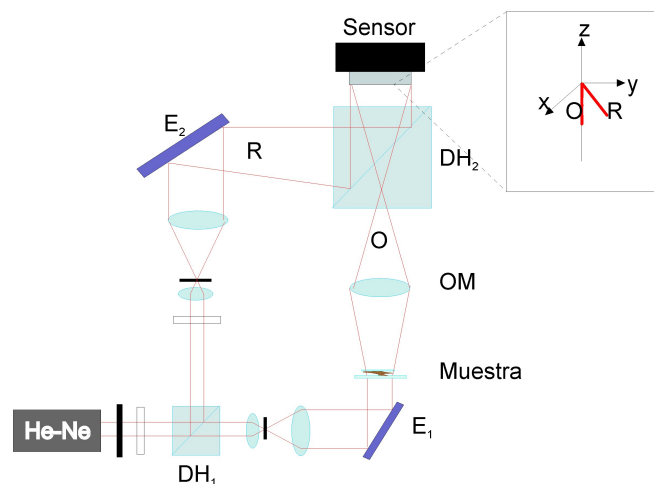


Figura 3.8.: Esquema de un microscopio holográfico por transmisión [CMD99].

de un objeto microscópico y su posterior reconstrucción numérica mediante una computadora usando los resultados teóricos de la teoría Escalar de la Difracción (Capítulo 2). En cuanto al montaje experimental, la configuración interferométrica para holografía se modifica para poder resolver las dimensiones involucradas. En general, se utiliza un láser como fuente de luz y se añaden al microscopio unos pocos elementos ópticos para configurar un pequeño *Interferómetro Mach Zehnder*. El haz objeto del interferómetro recorre el tren óptico normal del microscopio e ilumina la muestra biológica cuya imagen es formada por un OM de gran apertura numérica. A la salida del microscopio-interferométrico, el haz de referencia se recombina con el haz objeto mediante un Divisor de Haz (DH) e interfiere formando un holograma en el sensor CCD o CMOS de una cámara digital, que puede coincidir o no con el plano imagen del objetivo.

Se distinguen dos tipos básicos de configuraciones para la implementación de la MHD de acuerdo a las características de la muestra de estudio: el de transmisión, para el uso de muestras transparentes (Figura 3.8); y el de reflexión, para el uso de muestras opacas (Figura 3.9). El OM colecta la onda objeto transmitida o reflejada por el espécimen respectivamente. En particular, en el microscopio por reflexión se inserta en el brazo objeto, una lente de gran distancia focal entre el expansor de haz y el objetivo de microscopio. Esta lente actúa como un condensador, y su posición se ajusta adecuadamente para iluminar la muestra con un haz colimado. La fuente de luz suele ser un láser He-Ne, pero también se usan fuentes de baja coherencia o incluso láseres sintonizables.

En las aplicaciones desarrolladas en esta tesis se considera, la geometría fuera de eje discutida en la Subsección 3.1.3. Para ello, se inclina ligeramente el espejo E_2 y/o el divisor de haz DH_2 , que acopla los dos haces para ser dirigidos de nuevo al sensor. Es decir, se considera que el haz de referencia llega al sensor con un pequeño ángulo

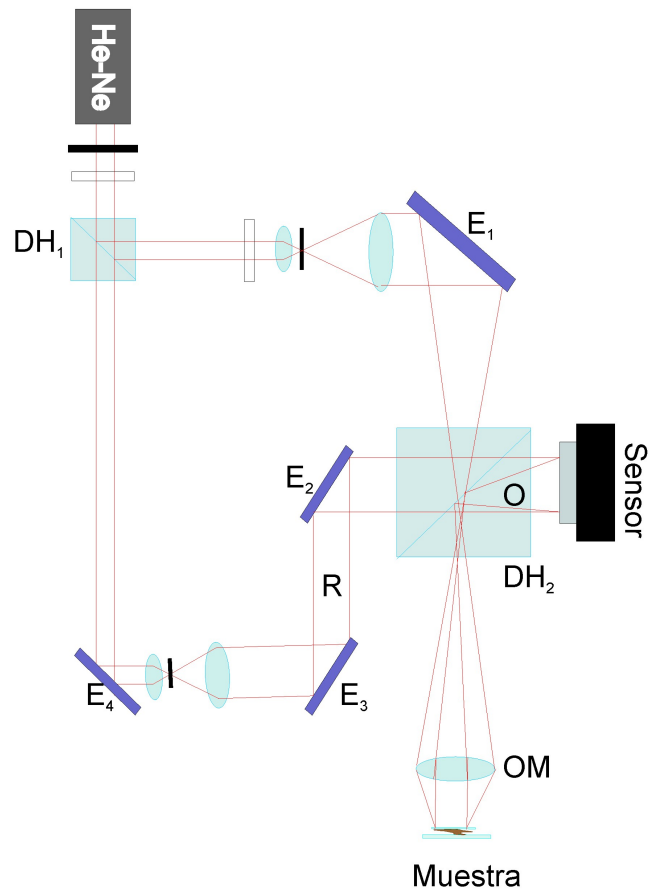


Figura 3.9.: Esquema de microscopio holográfico por reflexión [CMD99].

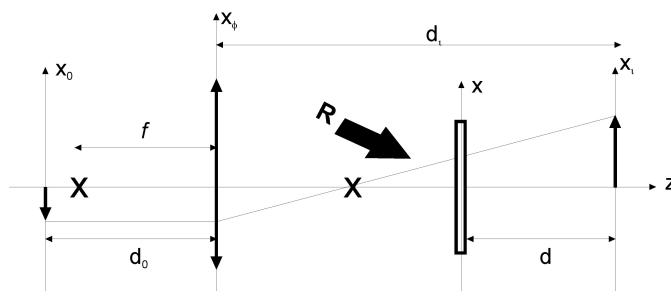


Figura 3.10.: Configuración para microscopía holográfica.

θ con respecto a la dirección de propagación de la onda objeto.

Si bien la microscopía holográfica ha sido propuesta en varias configuraciones, en este trabajo se usará particularmente la arquitectura propuesta por VANLIGTEN y OSTERBERG [LO66]. El arreglo óptico del brazo objeto se ilustra en la Figura 3.10: asumiendo que la muestra se encuentra a una distancia d_o del OM, cuando la distancia d_o es ligeramente mayor que la distancia focal f del OM, éste último forma una imagen real, aumentada e invertida de la muestra a una distancia d_i sobre el eje óptico. La particularidad aquí, es que el plano del holograma (esto es, el plano del sensor) se ubica entre el OM y el plano imagen, a una distancia d de la imagen. Esta situación puede considerarse equivalente a una configuración holográfica sin lente con una onda objeto emergiendo directamente de la imagen aumentada y no del objeto en sí mismo. En otras palabras, en el sensor se registra la interferencia entre la onda de referencia y la onda que se dirige a formar la imagen real.

Puesto que el sensor no se ubica en el plano imagen del OM, el holograma consiste en la imagen desenfocada de la muestra modulada por franjas brillantes y oscuras producto de la interferencia. El registro fuera de foco resulta conveniente si se desean reconstruir los hologramas mediante el *Método de Fresnel*, ya que éste surge de una aproximación válida para distancias d que verifican la Ecuación 2.21 (d no puede ser cero). La propagación del espectro angular no impone este tipo de condiciones, con lo cual los hologramas pueden registrarse enfocados; esto es, con el plano imagen en el plano del sensor.

Si bien en principio el OM puede tener cualquier aumento, se prefiere que el mismo sea de gran aumento y de gran apertura numérica (AN), ya que permite adaptar de manera simple la capacidad de muestreo de la cámara con el contenido de información del holograma. Tal como se ilustra en la Figura 3.11 [Cha07], la introducción del OM logra una reducción de las componentes k_x y k_y del vector \vec{k} en el plano del espécimen perpendicular al eje óptico. El factor de reducción está dado por el aumento del OM. Las nuevas componentes k'_x y k'_y del vector de onda \vec{k}' del haz luego de atravesar el OM pueden hacerse tan chicas como se deseen para satisfacer las condiciones impuestas por el teorema de WHITTAKER-SHANNON de acuerdo a la capacidad de muestreo fijada por el tamaño de píxel de la cámara. Esto se optimiza

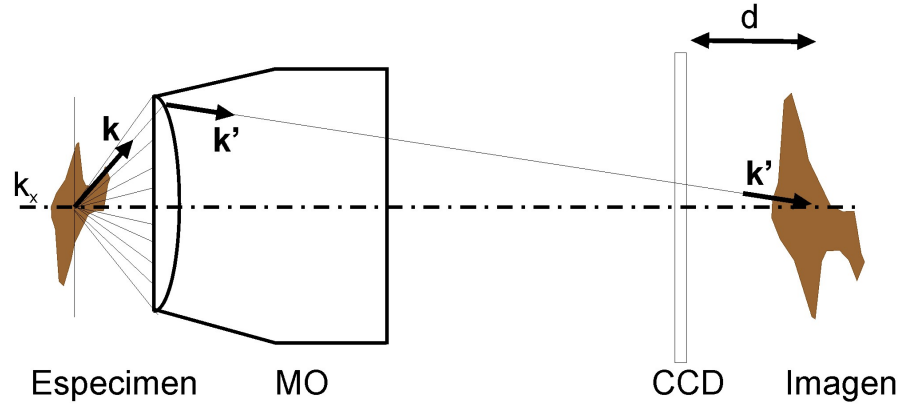


Figura 3.11.: Uso de un Objetivo de Microscopio para adaptar la capacidad de muestreo del sensor en el plano del holograma con el espectro del objeto

al usar un OM de gran aumento. Al mismo tiempo, grandes AN permiten maximizar la resolución transversal hasta llevarla al límite de resolución por difracción.

3.3.2. Consideraciones para la reconstrucción

La MHD permite, en principio, la reconstrucción de amplitud y fase del frente de onda a partir de un solo holograma. La reconstrucción numérica consiste, básicamente, en propagar el frente de onda desde el plano del holograma Oxy hasta algún plano imagen $O\xi\eta$ ubicado a una distancia d . Esto puede lograrse con cualquiera de los formalismos discutidos en la Subsección 3.2.2. Al considerar el holograma como una red difractante, se puede calcular el patrón de difracción de Fresnel o emplear el método de la Convolución o propagar el espectro del frente de onda y luego efectuarle una Transformada de Fourier inversa [CMK⁺06, MYLK05]. En cualquier caso, se requiere la realización de una o más Transformadas de Fourier; típicamente, el cálculo se efectúa mediante el algoritmo de la *Fast Fourier Transform* (FFT), disponible en las librerías de la mayor parte de los lenguajes de programación. Este algoritmo demanda que las señales bidimensionales a transformar sean cuadradas de dimensiones N^2 , lo que no siempre es óptimo o deseable. Por ello, en el contexto de esta tesis, no sólo se utiliza el algoritmo de la FFT, sino también se implementa la DFT (Transformada de Fourier Discreta, de las siglas en inglés de Discret Fourier Transform) para extender el uso a imágenes de cualquier dimensión.

En cualquier caso, el resultado es un arreglo matricial de números complejos llamado frente de onda reconstruido $\Psi(\xi, \eta, d)$, que representa la amplitud compleja del campo óptico en el plano de observación. En la versión discreta, ésta es una matriz de números complejos $\Psi(m, n, d)$, desde la cual puede obtenerse toda la información de la amplitud de la onda objeto a partir de una *imagen de contraste de*

amplitud. Por su parte, una *imagen de contraste de fase* es una matriz que provee toda información cuantitativa de la fase módulo 2π .

La intensidad (o módulo cuadrado) de $\Psi(\xi, \eta, d)$, se calcula:

$$I(\xi, \eta, d) = \text{Re}[\Psi(\xi, \eta, d)]^2 + \text{Im}[\Psi(\xi, \eta, d)]^2 \quad (3.15)$$

o bien, en su versión discreta

$$I(m, n) = \text{Re}[\Psi(m, n, d)]^2 + \text{Im}[\Psi(m, n, d)]^2$$

La imagen de contraste de fase se obtiene al calcular el argumento de $\Psi(\xi, \eta, d)$:

$$\phi(\xi, \eta, d) = \arctan \left[\frac{\text{Im}[\Psi(\xi, \eta, d)]}{\text{Re}[\Psi(\xi, \eta, d)]} \right] \quad (3.16)$$

o bien, en su versión discreta

$$\phi(m, n) = \arctan \left[\frac{\text{Im}[\Psi(m, n, d)]}{\text{Re}[\Psi(m, n, d)]} \right]$$

Ahora bien, la distancia entre el plano del holograma Oxy y el plano de observación $O\xi\eta$ define la distancia de reconstrucción d . Para obtener una imagen reconstruida en foco, d debe ser igual a la distancia que existe entre el CCD y la imagen del objeto en la etapa de registro. Por lo tanto, si nos referimos a Figura 3.10, el plano Oxy es el plano del holograma y el plano $O\xi\eta$ es el plano donde el OM formó la imagen de la muestra en foco.

4. Implementación de la MHD

La implementación de la MHD en el laboratorio del Grupo de Óptica Láser devino en la construcción de un Prototipo Experimental para el registro de los hologramas y un paquete de programas para la reconstrucción y corrección de aberraciones. La configuración experimental empleada y los resultados de los primeros ensayos se exponen en el presente capítulo, en el cual también se realiza un análisis comparativo de los resultados alcanzados con los distintos métodos de reconstrucción. Gran labor se ha desarrollado en estos últimos años en la corrección de aberraciones. Los aspectos inherentes a este tópico en lo que se refiere a los métodos propuestos por otros autores como las contribuciones propias se reservan en su mayoría para capítulos siguientes.

4.1. Montaje experimental

En el marco de esta tesis se estudian especímenes biológicos transparentes que presentan características adecuadas para analizarlos vía la configuración por transmisión. En la fotografía de la Figura 4.1 se muestra el prototipo experimental del dispositivo que se construyó para el registro de los hologramas. Consiste básicamente en un interferómetro de Mach-Zehnder. El interferómetro tiene adosado, en el brazo objeto, una platina de microscopio con sus respectivos tornillos micrométricos, que permiten desplazar la muestra de manera lateral (para el recorrido de campos) y axial (para el movimiento del espécimen a lo largo del eje óptico). El OM se enrosca en un soporte, por lo que puede ser intercambiado con facilidad según sea conveniente, para visualizar especímenes de distintos tamaños. Las muestras son dispuestas entre un porta y un cubre objeto.

Como se ilustra en Figura 4.2, un haz de luz láser de He-Ne ($\lambda = 632,8\text{nm}$) linealmente polarizado de 10 mW, filtrado y colimado, es dividido en un haz de referencia y un haz objeto en el interferómetro mediante el cubo divisor de haz DH_1 . Éste último transmite el 50 % de la luz y refleja el 50 % restante (despreciando absorción y reflexiones secundarias, del orden del 5 %). La onda plana que recorre el brazo objeto, luego de ser reflejada por el espejo E_1 , atraviesa la muestra que se va a analizar. La onda difractada por el espécimen modifica esencialmente su fase y contiene toda la información de la estructura de la muestra. Esta es colectada y magnificada por un OM de 10X, 0.25AN, o alternativamente por uno de 40X, 0.65AN, de 20X, 0.40AN, o de 4X, 0.10AN, dependiendo del aumento lateral deseado. Al mismo

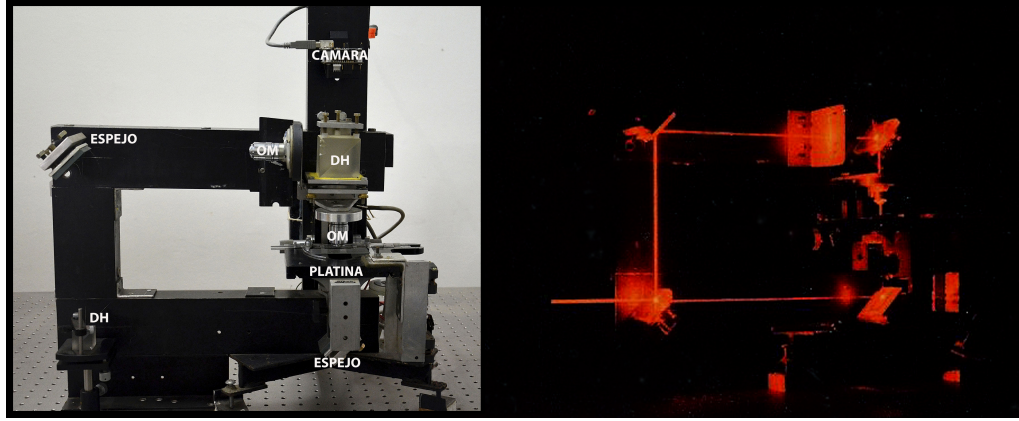


Figura 4.1.: fotografías del dispositivo.

tiempo, la onda plana que recorre el brazo de referencia se refleja en el espejo E_2 y luego en el divisor de haz DH_2 (Figura 4.2(a)). Las onda objeto y de referencia se recombinan en este segundo cubo divisor de haz, e interfieren en el espacio de salida. La interferencia se registra en el plano del sensor de una cámara digital ubicada entre el OM y el plano imagen de la muestra, de acuerdo a la configuración propuesta en la Subsección 3.3.1 y esquematizada en la Figura 3.10. De esta manera queda almacenada la información completa de amplitud y fase de la onda objeto que emerge de la muestra.

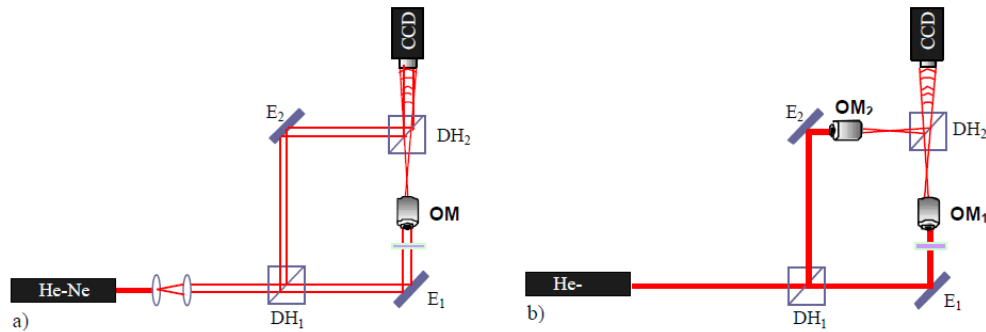


Figura 4.2.: esquema del interferómetro (a) con onda de referencia plana y (b) con OM en el brazo de referencia.

En otra disposición alternativa utilizada preponderantemente en este trabajo, la onda de referencia es magnificada por un OM de idénticas características al utilizado en el brazo objeto, y ubicado a la misma distancia del DH_2 que éste (Figura 4.2(b)). Con esto se logra que ambos frentes de onda tengan la misma curvatura con el propósito de disminuir errores de fase.

Para permitir la posibilidad de enfocar la muestra en diferentes planos, al interferómetro se le adosó un soporte vertical con perforaciones cada 5 cm para variar la

altura de la cámara CCD, tal como se observa en la foto izquierda de la Figura 4.1. La intensidad de los haces objeto y referencia se regula por medio de filtros neutros a los efectos de obtener un contraste adecuado de las franjas de interferencia.

El medio de registro es un sensor CCD con una matriz de $6,45\text{mm} \times 4,84\text{mm}$, que contiene $768(\text{H})\text{px} \times 572(\text{V})\text{px}^2$ (características de fábrica). Esto da una distancia entre píxeles adyacentes de $\Delta x \cong 8,39\mu\text{m}$ en la dirección horizontal y de $\Delta y = 8,46\mu\text{m}$ en la dirección vertical. Alternativamente, se ha usado también un sensor CMOS Bayer Array, que contiene $2592(\text{H})\text{px} \times 1944(\text{V})\text{px}^2$, con píxeles cuadrados de $1,75\mu\text{m}$ de lado. Para ambos casos la velocidad de cuadro (fotogramas por segundo) es de hasta 25 Hz.

En las primeras etapas experimentales, la salida análoga de vídeo, el holograma, se digitaliza y almacena en el *buffer* de un *frame grabber* Matrox Pulsar de 8 bit en el que la imagen es codificada en 256 niveles de gris. En una primera instancia el tamaño de las imágenes impuestas por el algoritmo de la FFT es de $512 \times 512\text{px}^2$ por lo que el software de adquisición y procesamiento se programó para que la imagen original se recortara a estas dimensiones. En etapas posteriores, no será necesario recortar las imágenes, puesto que se utilizarán otros algoritmos para calcular la DFT. La ventaja será que se podrán explorar campos de mayor tamaño en una sola adquisición sin la necesidad de recortar las imágenes a tamaños cuadrados.

Por último, por los motivos discutidos en la Subsección 3.1.3, los hologramas se registran en un esquema fuera de eje, inclinando ligeramente el espejo E_2 , e introduciendo así un pequeño ángulo θ entre el haz objeto y el de referencia.

El microscopio holográfico debe estar cuidadosamente alineado asegurando que la longitud de camino óptico de la onda objeto sea aproximadamente igual a la de la onda de referencia, y que la onda objeto incida normalmente al plano del sensor.

4.2. Experiencias preliminares

Se realizaron una serie de experiencias preliminares para la puesta a punto de la técnica. Las experiencias fueron diseñadas con el fin de realizar un estudio detallado de los parámetros óptimos para la implementación de la MHD en lo que concierne tanto al registro del holograma como a la reconstrucción. En estas experiencias se usó el sensor de una cámara CCD para el registro de los hologramas.

A continuación se muestran los resultados obtenidos en el marco del objetivo de esta tesis relacionados con la implementación de la MHD, por primera vez en los laboratorios del GOL, y en lo que respecta a nuestro conocimiento, por primera vez en Argentina. Se ejemplifica su puesta a punto con distintos tipos de muestras tales como estructuras algales inmersas en un medio acuoso, microorganismos presentes en el suero sanguíneo o estructuras formadas en una muestra de sangre seca. Una vez que los hologramas son registrados, se procede a su reconstrucción utilizando los

distintos métodos mencionados en la Subsección 3.2.2. Se muestran las imágenes de amplitud y de contraste de fase correspondientes.

4.2.1. Registro de los hologramas

Con el sistema óptico descrito en Figura 4.1 alineado, y usando el sensor de la CCD como medio de registro, se registran los hologramas. A modo de ejemplo en Figura 4.3, se muestran comparativamente dos hologramas obtenidos con las configuraciones ópticas de Figura 4.2. Se advierte que en los hologramas obtenidos, aparece un patrón de franjas curvas las que como consecuencia de la geometría fuera de eje, no son concéntricas con respecto al centro de la imagen.

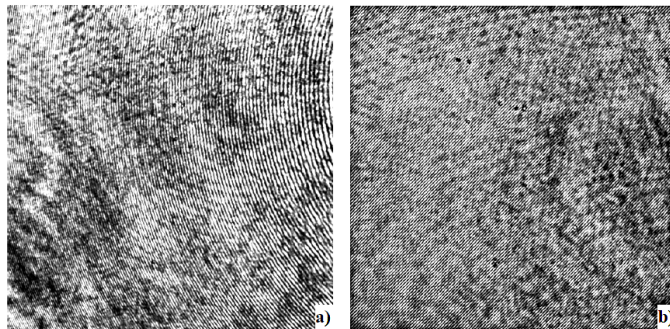


Figura 4.3.: Holograma típico: (a) con montaje de Figura 4.2(a), y (b) con el montaje de Figura 4.2(b).

La exagerada curvatura de la micro-interferencia observada en la Figura 4.3(a) se debe a que el OM produce un frente de onda esférico que altera exclusivamente a la distribución de fase de la onda objeto, como se ilustra en el esquema de Figura 4.4. Esta situación se traduce en una aberración en la fase que debe corregirse convenientemente, ya que se propaga hasta el plano de observación y altera la calidad de las imágenes de contraste de fase que se obtienen.

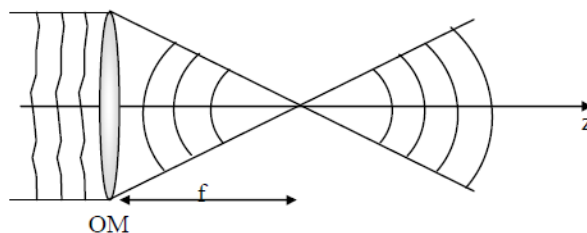


Figura 4.4.: Esquema de la deformación del frente de onda inducida por el OM.

En la literatura se describen diversas alternativas numéricas y físicas para corregir este problema. Entre las últimas, una de ellas consiste en insertar en el brazo de referencia un OM idéntico al utilizado para amplificar la muestra y a la misma distancia

respecto del DH_2 , y se adoptará en este trabajo en estas instancias preliminares. Como consecuencia, en el sensor se registra la interferencia entre dos frentes de onda de igual curvatura. En Figura 4.3(b) se muestra un holograma típico, registrado según este montaje.

4.2.2. Reconstrucción de los hologramas

Para la reconstrucción de los hologramas se usaron los tres métodos numéricos estudiados en la Subsección 3.2.2; i.e., *Método por Aproximación de Fresnel*, *Método de la Convolución* y *Método de la Propagación del Espectro Angular* (PEA, en lo sucesivo). Brevemente, los métodos de reconstrucción suponen, la manipulación digital de la matriz de números reales $I_H(j, l)$, la realización de operaciones matemáticas sobre cada uno de los elementos matriciales y la reconversión del resultado final en una imagen escalada en 256 niveles de gris.

Con este fin, en una primera instancia se desarrollaron programas en lenguaje VISUAL BASIC 6.1[®], compatible con la librería de procesamiento de imágenes MATROX MIL 32. Todos ellos simulan la reconstrucción óptica típica empleada en holografía convencional, es decir la iluminación del holograma con una réplica del haz de referencia. Como ya se explicó, si consideramos al holograma $I_H(j, l)$ como una red de difracción que descansa en el plano del CCD, la reconstrucción numérica implica, en primer lugar, computar el frente de onda digital $\Psi(j\Delta x, l\Delta y)$ justo por detrás del plano del holograma ($z = 0^+$). Numéricamente, este frente de onda se obtiene multiplicando el holograma digital $I_H(j, l)$ por un haz de referencia numérico $R_D(j, l)$, llamado haz de referencia digital. Luego, $\Psi(j\Delta x, l\Delta y)$ debe propagarse una distancia d hasta el plano de observación.

A continuación se resume la metodología empleada para la reconstrucción por cada uno de los métodos.

Método de Fresnel Los pasos que se siguen en este método de acuerdo a la Ecuación 3.8 son:

1. El holograma se muestra en pantalla y es multiplicado punto a punto por un haz de referencia digital, cuya simulación se detallará en la Subsección 4.2.6. El producto resulta en una matriz de números complejos.
2. A continuación se efectúa la multiplicación compleja punto a punto de la matriz anterior con la matriz $\exp\left(-i\frac{\pi}{\lambda d}(j^2\Delta x^2 + l^2\Delta y^2)\right)$ que en lo sucesivo llamaremos función *chirp*. Esto requiere la introducción por teclado de la distancia de propagación d .
3. Por último, al resultado se le realiza una DFT e inmediatamente se la multiplica por los factores de fase externos a la integral en la Ecuación 3.8 que aparecen en la descripción teórica del método. En pantalla se despliegan las imágenes de amplitud y fase del campo reconstruido.

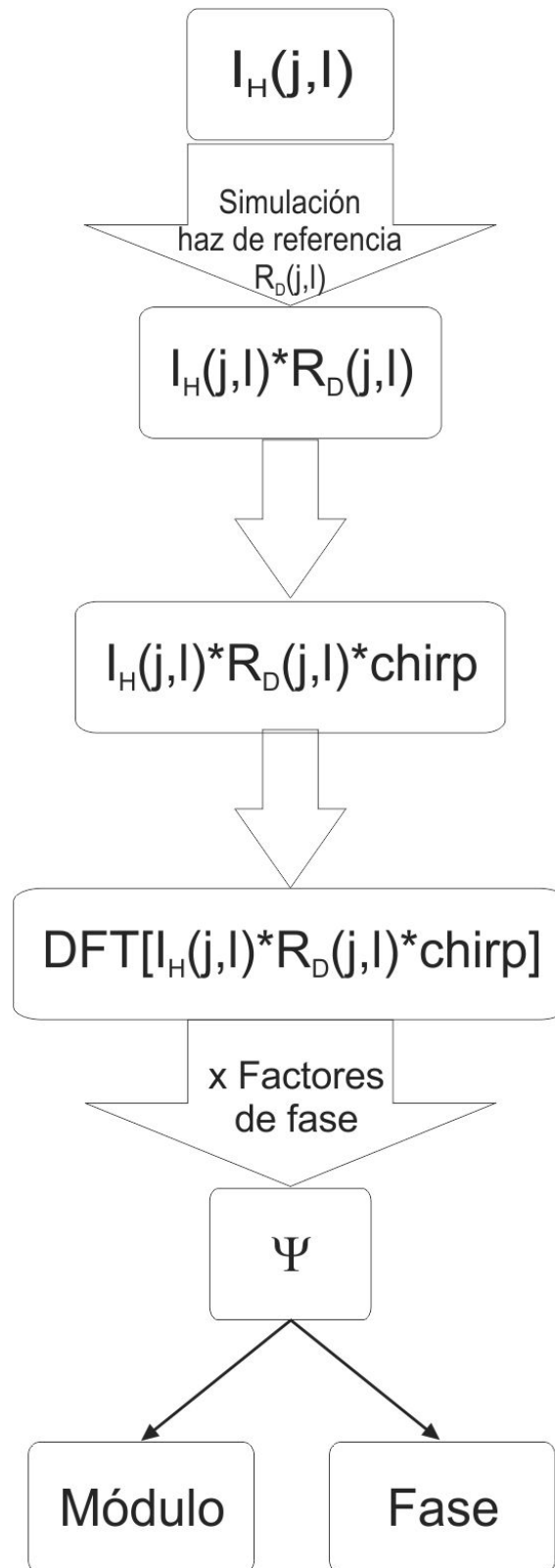


Figura 4.5.: Diagrama para la implementación del método de Fresnel.

En la Figura 4.6 se muestra una vista del formulario en VISUAL BASIC® del software diseñado.

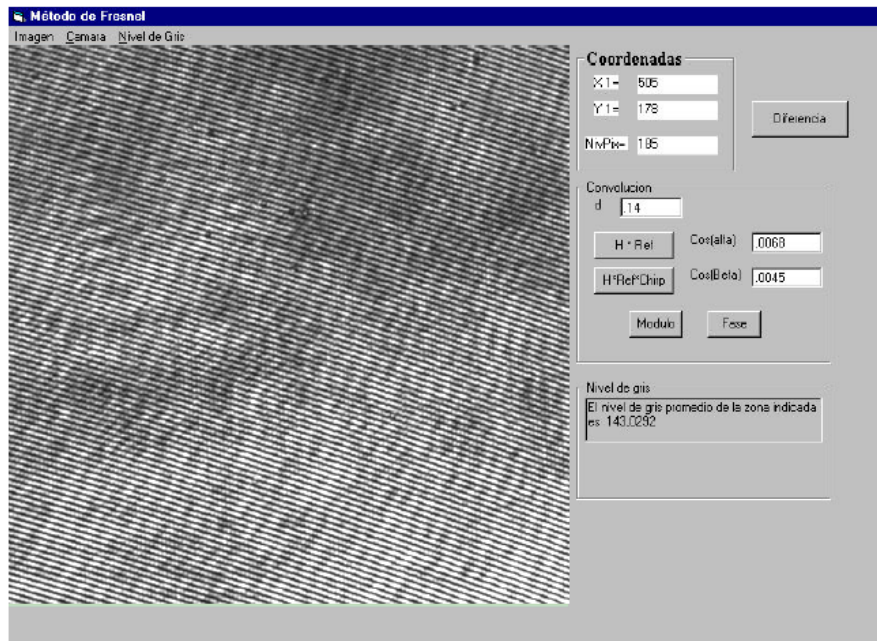


Figura 4.6.: Formulario programa método de Fresnel

A modo de ejemplo, en la Figura 4.7 se muestran una serie de imágenes de amplitud de un objeto, obtenidas por este método para diferentes distancias de registro, d .

Es evidente que la separación entre los órdenes de difracción aumenta, conforme lo hacen los valores de d ; es decir mientras más alejado se encuentra el plano imagen del OM respecto del sensor. Al mismo tiempo, la fracción de la imagen que ocupa cada término disminuye, perdiéndose resolución de la porción de interés.

Con el fin de lograr, en la instancia de reconstrucción, la mínima perturbación del orden cero y el máximo tamaño de la imagen, se determinó experimentalmente para este caso, que la distancia óptima de reconstrucción está dada para $d = 13\text{cm}$ cuando la cámara está ubicada a 26cm del OM_1 . Particularmente, la imagen en la Figura 4.7(b) muestra el efecto de aliasing, el que se manifiesta para distancias d menores a la distancia mínima de reconstrucción. Entre otras causas, esto se debe a que la frecuencia de la función *chirp* (que tiene una fuerte dependencia con esta distancia), se vuelve extremadamente alta y no puede ser muestreada adecuadamente en una matriz cuadrada de N^2 elementos, lo que hace que la aproximación de Fresnel (Ecuación 2.25) no sea adecuada para calcular la propagación de la onda. El orden cero en estas imágenes ha sido atenuado sustrayendo al holograma la intensidad promedio de todos los píxeles, mediante la técnica explicada en [SW05] (Ver Capítulo 6).

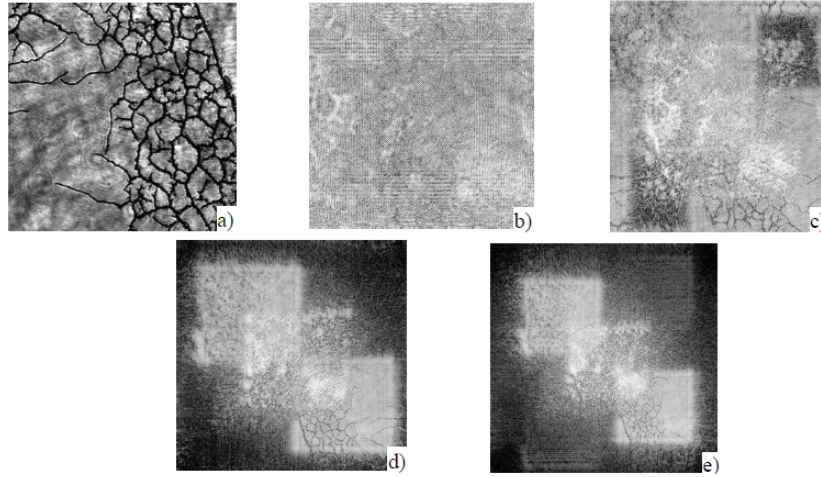


Figura 4.7.: (a) objeto de referencia, Imágenes de amplitud para distintos hologramas cuya distancia de reconstrucción es: (b) $d = 5\text{cm}$, (c) $d = 8\text{cm}$, (d) $d = 13\text{cm}$ y (e) $d = 17\text{cm}$.

Métodos de la Convolución y Propagación del Espectro Angular (PEA) El procedimiento de reconstrucción está dado por la implementación de la Ecuación 3.14 y Ecuación 3.13; ambos métodos comparten varios puntos en común, diferenciándose en una sola etapa como se explica en lo que sigue:

1. Se multiplica punto a punto la matriz holograma por el haz de referencia digital correspondiente (Ver Subsección 4.2.6).
2. Se realiza la DFT de este producto.
3. En el espacio de frecuencias se filtra alternativamente el orden correspondiente a la imagen real o virtual. Opcionalmente, el espectro filtrado puede centrarse en el Espacio de Fourier, llevando la frecuencia portadora de la imagen real (virtual) hacia el centro del espectro.
4. a) Para el método PEA: se multiplica el espectro por la matriz que caracteriza el factor de propagación del espectro angular F_p , definido en la Subsubsección 3.2.2.3.
b) Para el caso del método de la convolución, se multiplica el espectro por la función de transferencia G , dada por la Ecuación 3.12.
5. Se realiza la transformada inversa IDFT, exhibiéndose en pantalla las imágenes de contraste de amplitud y contraste de fase, ambas convenientemente escaladas. Todos estos pasos se esquematizan en el diagrama de la Figura 4.8.

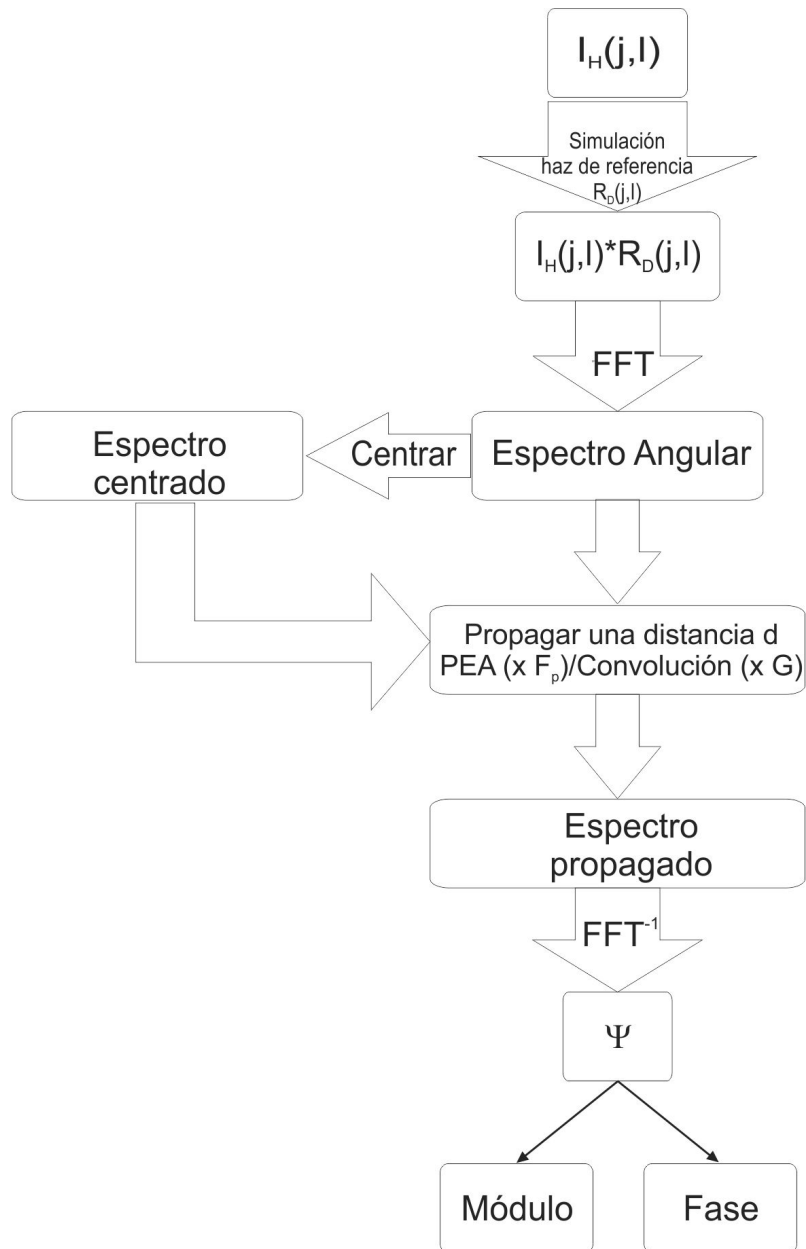


Figura 4.8.: Diagrama para la implementación del método de la convolución y de la PEA.

En la Figura 4.9 se muestra la interfaz de los programas diseñados en Visual Basic con este fin.

El filtrado espacial tiene como único objetivo eliminar el orden cero de difracción, que usualmente tiende a quitarle calidad a los hologramas reconstruidos. Debido a que el registro holográfico se hace en una geometría fuera de eje, en el dominio de Fourier los tres órdenes de difracción (orden cero, imagen real e imagen virtual) se encuentran ubicados en diferentes posiciones, como muestra en la Figura 4.10. En

la misma, resultado de aplicar la DFT a un holograma, el orden cero se localiza alrededor del origen $(0, 0)$, la imagen real está centrada en $(-\cos[\alpha/\lambda], -\cos[\beta/\lambda])$ y la imagen virtual en $(\cos[\alpha/\lambda], \cos[\beta/\lambda])$ (Ver Subsección 4.2.6). En consecuencia, mientras mayor sea la separación relativa de los haces en la etapa de registro, más separados estarán los órdenes y más sencillo resultará filtrar alguno de ellos, sin que se vea perturbado por los otros. Claramente existe un límite, que no puede superarse, que es el determinado por el máximo ángulo posible entre los haces, el cual, como vimos en la Ecuación 3.6 viene determinado por la resolución de las franjas de interferencia (holograma) por el CCD.

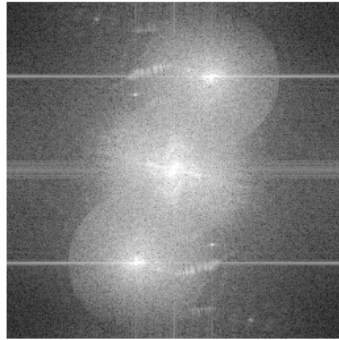


Figura 4.10.: espectro angular de un holograma típico.

En el caso del Método de la Convolución y del Método PEA, una vez realizada la multiplicación punto a punto del holograma por el haz de referencia digital, el filtrado espacial consiste en la aplicación del filtro de interés en el espacio de frecuencias. Acto seguido, al efectuar el proceso de reconstrucción, las imágenes de amplitud aparecerán descentradas y fraccionadas como resultado de la geometría fuera de eje, a menos que previamente el espectro sea centrado en el dominio de Fourier.

Para ejemplificar este hecho, en la Figura 4.11 se muestran las imágenes de amplitud de un holograma obtenidas con el método PEA, tanto cuando el espectro es propagado inmediatamente luego de ser filtrado, como cuando, previo a su propagación, el orden de interés se centra en el dominio de Fourier. En el primer caso, se han marcado sobre la imagen líneas que delimitan porciones de la imagen que ha sido perjudicada por la geometría fuera de eje. También se exhibe, para comparar, el objeto del cual se realizó el holograma.

Las ventajas que ofrecen tanto el método PEA como el de la Convolución es que las imágenes de contraste de amplitud y contraste de fase son de $N \times M$, es decir se muestran naturalmente en pantalla con las mismas dimensiones que el holograma original, a diferencia del método de Fresnel en el cual los tres órdenes de difracción se muestran en una única imagen. Además, filtrar las componentes de interés en el dominio de Fourier es sencillo, eliminándose la perturbación del orden cero.

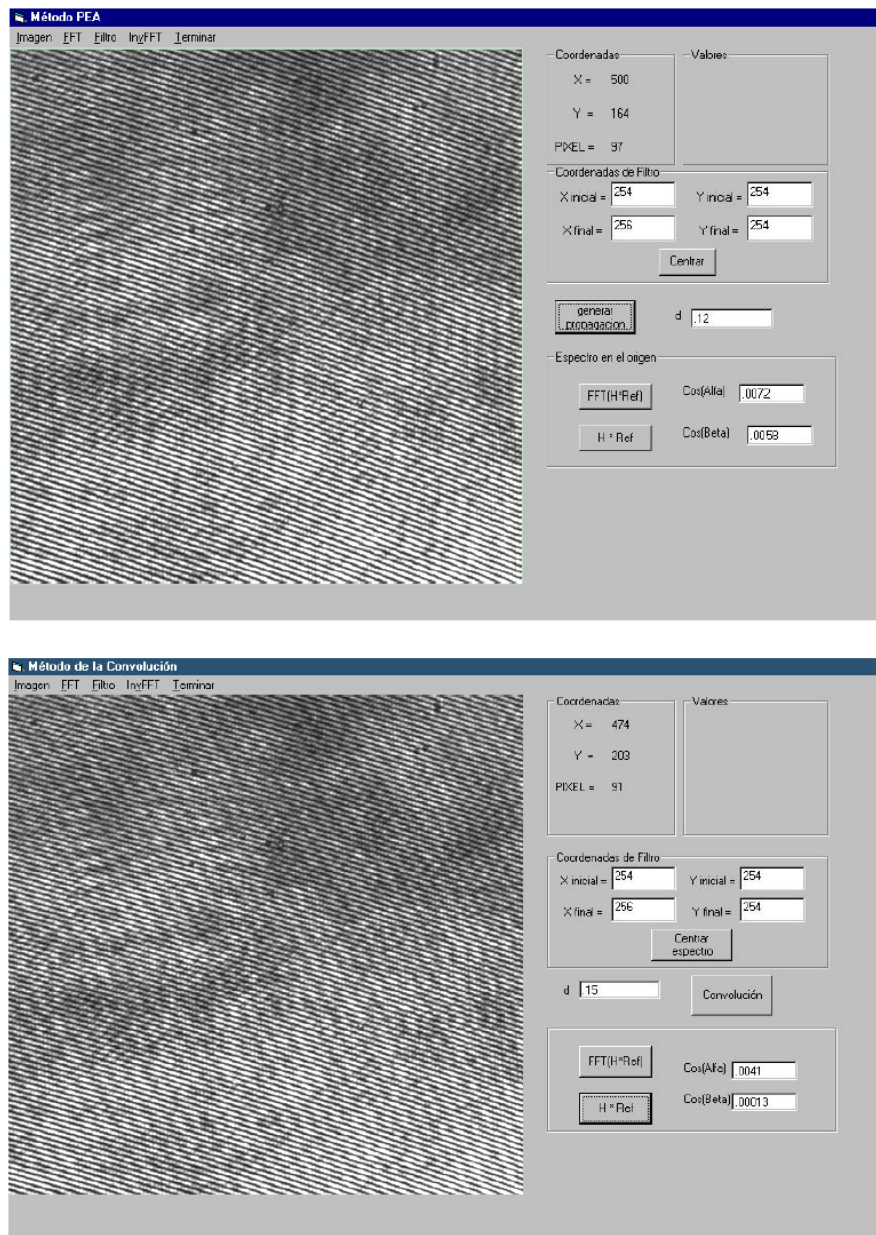


Figura 4.9.: Formulario programa método de método de la convolución y de la PEA.

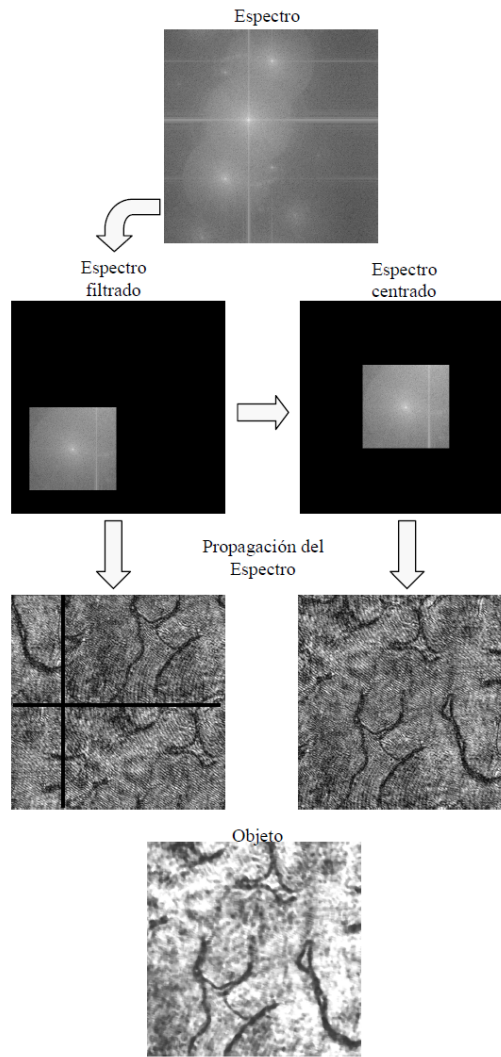


Figura 4.11.: Esquema que ilustra el proceso de filtrado.

4.2.3. Medición de las distancias de reconstrucción

Como se mencionó en la Subsección 3.3.1, la distancia d empleada en la reconstrucción numérica (de amplitud y fase) de los hologramas, debe ser la que en el proceso de registro existió entre el plano imagen del OM y el plano del holograma. Una de las virtudes de la MHD es que, aún sin el conocimiento a priori de la distancia d , se puede obtener una imagen de contraste de amplitud enfocada. El procedimiento consiste en reconstruir numéricamente el holograma para distintas distancias d hasta encontrar el valor que mejor enfoca la imagen, emulándose así el proceso mecánico de enfoque de la microscopía convencional. En la literatura[LU04] se reportan diversos mecanismos de autofocus que permiten un escaneo automático de la distancia

de reconstrucción. No obstante, en las etapas preliminares se entiende que debe tenerse cierto control sobre este parámetro, por lo que el control experimental cobra especial importancia. En la Sección 6.4 se implementa un método de autofocus, dentro de un conjunto de técnicas que apuntan a la automatización de los parámetros involucrados del mecanismo de reconstrucción.

Una de las posibilidades inmediatas para determinar la distancia óptima de reconstrucción, consiste en enfocar la muestra en el plano del sensor CCD, a continuación desplazar el CCD una cantidad d hacia abajo (ajustando la cámara en otra posición) y entonces registrar el holograma. El inconveniente está en el tiempo que demanda este proceso, con la complicación adicional de la pérdida de alineación del sistema.

Asimismo, puede fijarse la cámara en una posición y sacar provecho del movimiento controlado que ofrecen los tornillos micrométricos de la platina (el ajuste fino tiene una apreciación de un micrón). Así, si el plano imagen inicialmente se encuentra en el plano del CCD, al acercar la muestra al OM unos cuantos micrones, el plano imagen se desplaza por detrás del CCD una distancia d (que será la distancia de reconstrucción). Los OM tienen una distancia focal muy corta, por lo que al acercar el objeto a ellos unos pocos micrones, la imagen se aleja varios centímetros. El objetivo es determinar cuánto exactamente se desplaza la imagen, conociendo el desplazamiento axial de la muestra; esto es, determinar la distancia d de reconstrucción para cada caso.

Para ello, se registró el desplazamiento que debe hacerse en la platina para enfocar la imagen de un objeto conocido en cada una de las posiciones posibles para la cámara CCD; esto es para $d = 5\text{cm}, 10\text{cm}, 15\text{cm}$, etc. Se eligió como objeto de prueba una escala micrométrica que contiene 100 líneas en 1mm (esto es, una separación entre líneas de 0.01mm). A modo de ejemplo, se muestran los resultados obtenidos cuando se empleó un OM de 10X.

Si se asume que el OM se comporta como una lente delgada, de la conocida ecuación del constructor de lentes $\frac{1}{f} = \frac{1}{p} + \frac{1}{q}$, con p y q las distancia objeto e imagen respectivamente, se puede obtener una curva de calibración que nos permita conocer la distancia de reconstrucción d , cuando se conoce el desplazamiento axial micrométrico realizado en la platina. A modo de ejemplo, en la Figura 4.12, se muestra la curva de calibración del objetivo de 10X.

4.2.4. Enfoque numérico

En la Figura 4.13 se muestran las imágenes de amplitud para diferentes valores de d , que resultan al reconstruir un holograma por el método de Fresnel (para favorecer la visualización, se ha recortado de la imagen de contraste de amplitud la porción correspondiente a la imagen virtual). El objeto utilizado es una burbuja en una muestra de sangre. Se advierte claramente que la distancia de reconstrucción está fuertemente ligada al enfoque de la imagen. Por lo tanto, el ajuste de este valor puede considerarse la contraparte digital del proceso de enfoque en microscopía

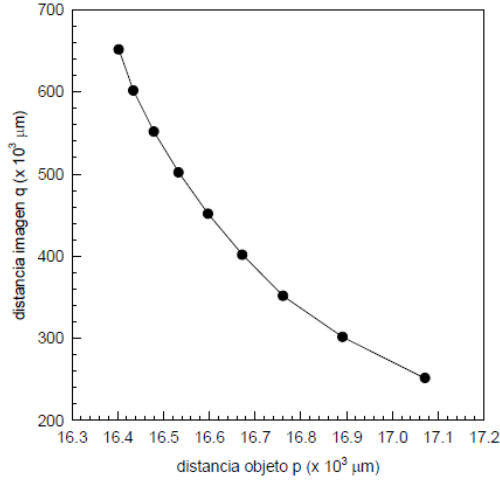


Figura 4.12.: Calibración de la curva de un OM de 10X.

convencional, donde la misma operación se lleva a cabo trasladando la muestra a lo largo del eje óptico.

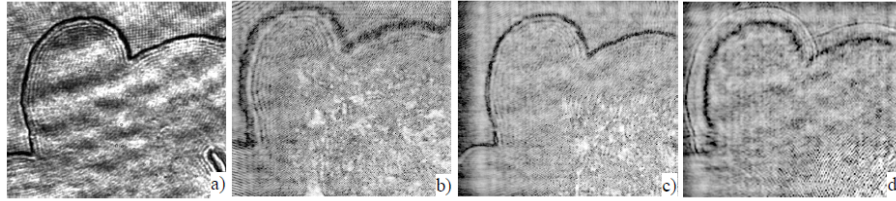


Figura 4.13.: (a) objeto de referencia, imagen de amplitud reconstruida a: (b) $d = 9\text{cm}$; (c) $d = 12\text{cm}$ (distancia óptima) y (d) $d = 18\text{cm}$.

4.2.5. Tamaño de los campos de reconstrucción

Con el objeto de determinar las dimensiones reales del campo bajo estudio, se utilizó como espécimen la escala micrométrica descrita anteriormente. El tamaño de la imagen depende, naturalmente, de la relación q/p que existe entre la distancia imagen q y la distancia objeto p y de la distancia focal f del OM. Es decir, mientras más alejada del objetivo ($d > q$) coloquemos la cámara, la imagen enfocada sobre el CCD será mayor y por lo tanto el campo visual será menor: dado que el sensor tiene un tamaño fijo captará una porción menor de imagen.

A modo de ejemplo, si se fija la cámara a 26cm del OM_1 y se utiliza un OM de 10X, el campo bajo estudio que capta el CCD es de $270\mu\text{m} \times 270\mu\text{m}$. Análogamente, se determinó que para un objetivo de 40X el campo bajo estudio es de $170\mu\text{m} \times 170\mu\text{m}$. Puede observarse en la Figura 4.14 la imagen producida por el OM de 10X.

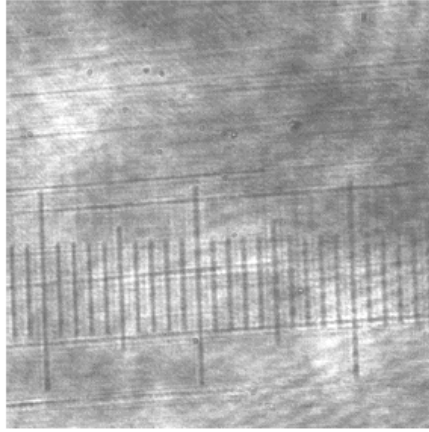


Figura 4.14.: Fotografía de la escala con un OM de 10X.

4.2.6. Determinación del ángulo entre el haz objeto y el haz de referencia

La geometría fuera de eje (Ver Sección 3.1.3), supone que el haz de referencia llega al sensor CCD con un pequeño ángulo θ con respecto a la dirección de propagación de la onda objeto. En la Figura 4.15 se muestra un esquema de los rayos que llegan al CCD correspondientes a la onda plana objeto y la de referencia. De acuerdo al sistema coordinado acoplado al CCD, la onda de referencia se propaga en una dirección dada por $\vec{k} = (k_x, k_y, k_z)$, formando con el haz objeto, de incidencia normal al CCD, un pequeño ángulo θ .

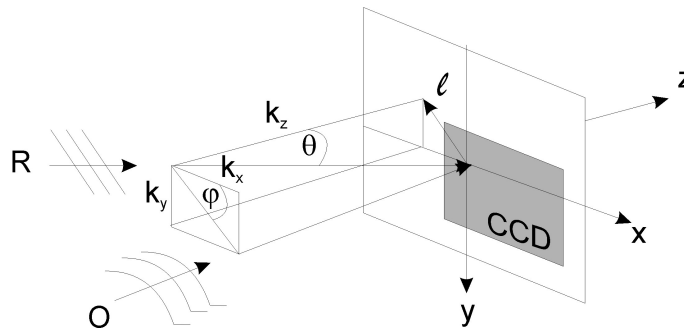


Figura 4.15.: (a) vista esquemática de la geometría fuera de eje, (b) vista lateral.

El ángulo θ debe ser compatible con los requerimientos de resolución de la cámara CCD. En la Subsección 3.2.1 se mencionó que el sensor resuelve la frecuencia de las franjas de interferencia siempre que el ángulo entre los haces no exceda cierto valor dado por la Ecuación 3.6. Según las características de la cámara disponible, esto da un valor límite de $\theta \approx 2,16^\circ$.

La medida del ángulo θ resulta difícil de realizar en la práctica. Una alternativa es aprovechar el hecho de que la separación de las franjas de interferencia entre

ambas ondas, da una medida de la inclinación relativa de los haces. Si se admite que los frentes de onda del haz objeto son paralelos al plano del CCD y que el haz de referencia es una onda plana, se pueden determinar unívocamente los ángulos α , β y θ , que el vector $\vec{k}_{\text{ref}} = (k_x, k_y, k_z)$ forma con los ejes coordenados x, y, z del sistema cartesiano adosado al CCD (Figura 4.16). Las franjas son las intersecciones de los frentes de onda del haz de referencia con el frente de onda del haz objeto que coincide con el plano del CCD.

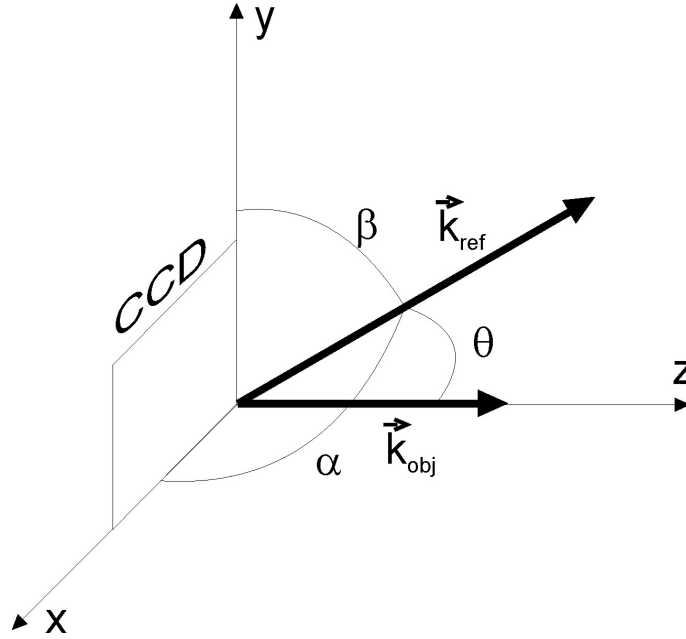


Figura 4.16.: Esquema de los ángulos que forma el vector \vec{k}_{ref} con los ejes coordenados.

Cuando la inclinación del haz de referencia con respecto al haz objeto es muy pequeña, las franjas están muy separadas y en el CCD sólo se visualizan unas pocas de ellas o quizá ninguna. Conforme la inclinación aumenta, el número de franjas en el CCD también lo hace. Dado que un frente de onda está separado en una longitud de onda λ del siguiente, en el límite, cuando \vec{k}_{ref} es perpendicular a \vec{k}_{ob} (es decir cuando \vec{k}_{ref} yace sobre el plano del CCD) la distancia interfranja L será λ y como se puntualizó en la Figura 2.2, tales franjas no podrán ser resueltas por el CCD. En cualquier situación intermedia, la distancia interfranja L es de varias longitudes de onda. Si θ es menor que $\theta_{\text{máx}}$ el sensor las resuelve adecuadamente.

Cuche *et al.* [CBD99] encontraron que para poder tener acceso cuantitativo a la fase es esencial la calibración adecuada del haz numérico utilizado en la reconstrucción numérica de los hologramas. Básicamente, el conocimiento previo de las condiciones experimentales usadas en la etapa de registro deviene en una simplificación de la simulación del mismo. Por ejemplo, como primera aproximación, puede suponerse que no se comete error apreciable si se programa un haz de referencia digital plano y

de incidencia normal al CCD; esto es, con $\theta = 0$. En principio, éste no debiera diferir demasiado del haz de incidencia ligeramente oblicua que fue usado en la etapa de registro. En el plano del CCD ($z = 0$), un haz de este tipo puede escribirse como:

$$E_R(j, l) = a_R + i0$$

donde j y l son enteros (para una matriz cuadrada de $N \times N$ varían entre $-\frac{N}{2}$ y $\frac{N}{2} - 1$) y a_R denota a la amplitud real de la onda, cuyo valor puede fijarse en cualquiera de los 256 niveles de gris disponibles. Con esta hipótesis, los cálculos involucrados en la reconstrucción se simplifican notablemente. Por ejemplo fijando $a_R = 1$, el frente de onda inmediatamente detrás del holograma es simplemente: $\Psi(j\Delta x, l\Delta y) = E_R(j, l) I_H(j, l) = I_H(j, l)$. Esta aproximación es útil para obtener imágenes de contraste de amplitud [Sch94] y para la medición de deformaciones mediante interferometría holográfica, sin embargo falla a la hora de obtener imágenes de contraste de fase.

Para ilustrar este hecho, en la Figura 4.17 se muestra el holograma de una estructura que se forma en una muestra de sangre seca, y las imágenes de contraste de amplitud y fase correspondientes. En este caso, el holograma se registró usando un OM de 10X y la reconstrucción se hizo por el método de Fresnel y requirió una distancia de propagación $d = 14\text{cm}$.

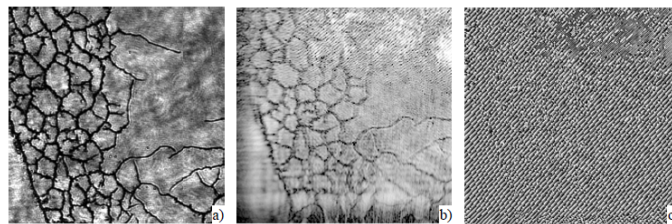


Figura 4.17.: (a) objeto de referencia, (b) imagen de amplitud y (c) Imagen de contraste de fase. Se ha recortado la zona de interés

A simple vista, la aleatoriedad de la información asociada a la fase limita la interpretación de las características morfológicas de la muestra en las imágenes de contraste de fase. Para la reconstrucción completa del frente de onda a partir de un solo holograma, el haz de referencia numérico $E_R(j, l)$ debe ser la contraparte digital *exacta* del haz de referencia utilizado en la etapa de registro $E_R(x, y)$. En tal caso, denotamos al haz de referencia digital como $R_D(j, l)$. Supongamos:

$$E_R(j, l) \propto \exp[i\phi_R(j, l)]$$

y

$$R_D(j, l) \propto \exp[i\phi_D(j, l)]$$

El frente de onda inmediatamente por detrás del holograma es:

$$\Psi(j\Delta x, l\Delta y) = R_D(j, l) I_H(j, l) = R_D |R|^2 + R_D |O|^2 + R_D E_R^* E_O + R_D E_R E_O^*$$

Puede verse que si R_D es igual a E_R , el producto $R_DE_R^*$ se vuelve real y puede reconstruirse amplitud y fase (E_O) de la imagen virtual; si R_D es una réplica del complejo conjugado de E_R , es la imagen real (E_O^*) la que puede ser reconstruida. Sin embargo, si R_D difiere considerablemente de E_R , la fase de la onda objeto queda notoriamente perturbada por la fase relativa entre estos ($\phi_D - \phi_R$).

Si asumimos que una onda de referencia perfectamente plana de longitud de onda λ fue usada en la etapa de registro holográfico, según la Ecuación 2.2 y la Ecuación 2.3 R_D en el plano del CCD, se escribe:

$$R_D(j, l) = A_R \exp \left[i \frac{2\pi}{\lambda} (\cos[\alpha] j \Delta x + \cos[\beta] l \Delta y) \right] = A_R \exp [i 2\pi (f_x j \Delta x + f_y l \Delta y)] \quad (4.1)$$

donde j y l son enteros entre $-\frac{N}{2}$ y $\frac{N-1}{2}$ (para una matriz cuadrada), mientras que Δx y Δy los intervalos de muestreo en el plano del holograma. El ajuste de la amplitud A_R no es de particular importancia y su valor puede fijarse a la unidad. Los parámetros $\cos\alpha$ y $\cos\beta$ son los cosenos directores, y requieren un ajuste preciso para que la fase ϕ_D sea igual a ϕ_R . Sus valores deben ajustarse de tal modo que los frentes de onda de R_D , coincidan lo más posible con los frentes de onda de la onda de referencia experimental E_R .

En las etapas preliminares estos parámetros se determinaron por prueba y error; un ajuste fino se llevó a cabo al remover todas las franjas en la imagen de contraste de fase de un objeto cuya fase se supone constante. Para ello, se usó una lámina de vidrio de calidad óptica como objeto de prueba, cuyo holograma fue reconstruido por el Método de Fresnel. Con la suposición de que este objeto no presenta variaciones apreciables en su morfología y/o índice de refracción, el mapa de fase obtenido debe estar codificado en un nivel de gris más o menos uniforme. En la Figura 4.18 se muestran los mapas de fase correspondientes a distintos valores de $\cos\alpha$ y $\cos\beta$.

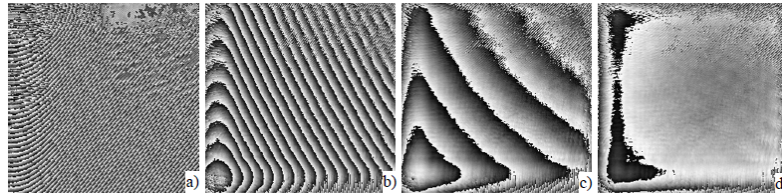


Figura 4.18.: Imagen de contraste de fase para distintos valores de $(\cos\alpha, \cos\beta)$, a): $(0, 0)$, b): $(0,0051, 0,0072)$, c): $(0,0068, 0,0062)$ y d): $(0,0072, 0,0058)$.

La Figura 4.18a) presenta el caso extremo de una imagen de contraste de fase obtenida con un haz de referencia normal al CCD. Por otro lado la imagen indicada con d), muestra la imagen de contraste de fase con los valores adecuados de $(\cos[\alpha], \cos[\beta])$, ya que allí la fase es prácticamente constante. Las perturbaciones espurias del extremo superior izquierdo se deben a la contribución del orden cero inherente al método de Fresnel.

De acuerdo a nuestra configuración experimental para estas aplicaciones, detallada en la Subsección 4.2.1, el haz de referencia utilizado en la etapa de registro no fue un haz de referencia plano, sino esférico, pues se usaron OM de idénticas características en ambos brazos del interferómetro. En este sentido, vale la pena resaltar que usar una onda plana para el haz de referencia digital corrige notoriamente la aberración de fase debida a la geometría fuera de eje. No obstante, es de esperar que la aberración esférica requiera de una corrección adicional, cuyo tratamiento se reserva para el Capítulo 7. De cualquier modo, se destaca que en el caso del holograma de la Figura 4.18 esta aberración es despreciable, mientras que la de la geometría fuera de eje reviste mayor importancia. Si se observa nuevamente la Figura 4.3(b), que ilustra el patrón de franjas típico en la configuración utilizada, se advierte que las franjas poseen una curvatura despreciable. Cuando se trabaja con OM de gran aumento, la porción de frente de onda esférico que llega al CCD puede, en una primera aproximación, considerarse plano. Por otro lado, cuando se usan OM de poco aumento, tales como los de 4X, la aberración esférica cobrará mayor importancia.

En resumen, con el ajuste preciso de los parámetros α y β se obtiene simultáneamente información cuali-cuantitativa de amplitud y fase a partir de un sólo holograma. Por este motivo la MHD compite ventajosamente con otras técnicas microscópicas, tales como la Microscopia de Zernike.

4.2.7. Comparación de métodos de reconstrucción

A los fines de establecer una comparación entre los resultados obtenidos por los tres métodos, en Figura 4.20, Figura 4.21 y Figura 4.22 se muestran las imágenes de amplitud para un campo de glóbulos rojos, obtenidas utilizando un OM de 40X, para una distancia de reconstrucción $d = 13\text{cm}$ y para el haz de referencia digital simulado con los parámetros geométricos adecuados. La imagen del campo bajo estudio y su correspondiente holograma se muestran en la Figura 4.19.

Se advierte que, cuando se emplea el método de la *Aproximación de Fresnel*, las imágenes reconstruidas se encuentran notablemente perturbadas por el orden cero. Una de las razones, es que el ángulo entre los haces es insuficiente para separar completamente los órdenes. En el método PEA y en el de la Convolución, la eliminación del orden cero es flexible ya que permite filtrar a conveniencia, el orden de difracción de interés en el dominio de frecuencias. Otra ventaja de relevancia de estos dos últimos métodos, es que el tamaño de la imagen propagada tiene la misma escala que la imagen del holograma (en este caso, la información de interés abarca $N^2\text{pix}^2$), exhibiendo en pantalla la información de interés de manera más práctica. En el caso de Fresnel, el campo reconstruido y el holograma tienen diferentes escalas. Si bien pareciera que uno podría «ganar» o «perder» resolución operando con el método de Fresnel, para todos los casos $\lambda d/N\Delta x$ (Ecuación 3.10) corresponde al límite de resolución dado por difracción del sistema óptico. El holograma es la apertura del sistema óptico de longitud de lado $N \times \Delta x$. De acuerdo a la teoría de la difracción,

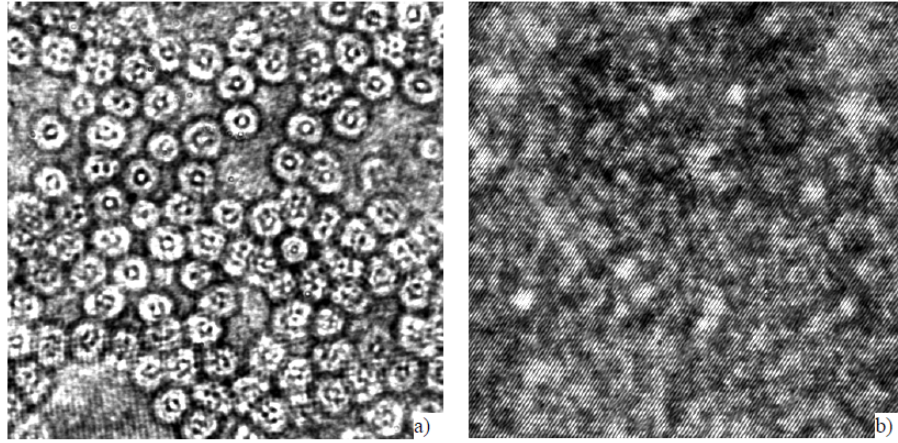


Figura 4.19.: Glóbulos rojos. (a) objeto y (b) holograma.

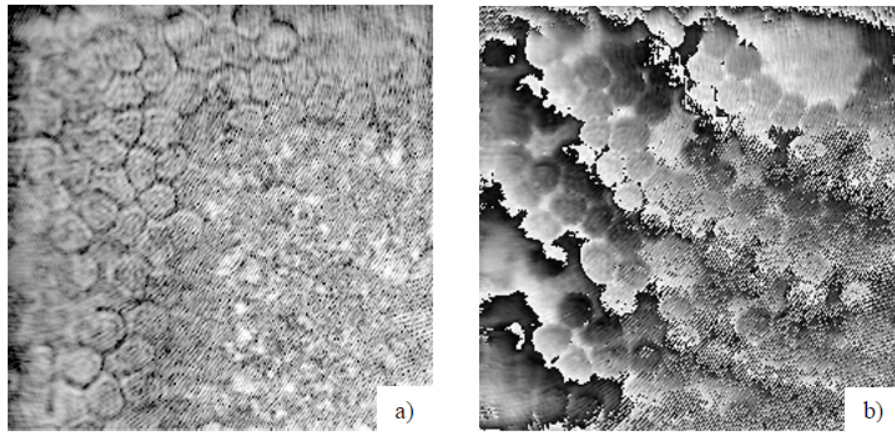


Figura 4.20.: Método de Fresnel. (a) imagen de amplitud y (b) imagen de contraste de fase.

a una distancia d detrás del holograma, $\lambda d/N\Delta x$ es el diámetro del disco de Airy (o diámetro de speckle) en el plano de reconstrucción, el cual limita la resolución [Col06].

Los resultados obtenidos por el método de la convolución muestran que no ha sido posible eliminar completamente los efectos que la geometría fuera de eje ocasiona en las imágenes de amplitud y de contraste de fase: en la Figura 4.22, la imagen de amplitud se encuentra dividida en fracciones. Por último, una ventaja extra del método PEA, es que no exhibe efectos de aliasing cuando se reconstruye a pequeñas distancias, permitiendo incluso la reconstrucción a distancias nulas.

De estas consideraciones, se concluye que en el método PEA las condiciones experimentales que deben cumplirse son menos restrictivas y resulta, por lo tanto, el más versátil de los tres. En los capítulos siguientes, éste será el método empleado para la reconstrucción numérica de los hologramas.

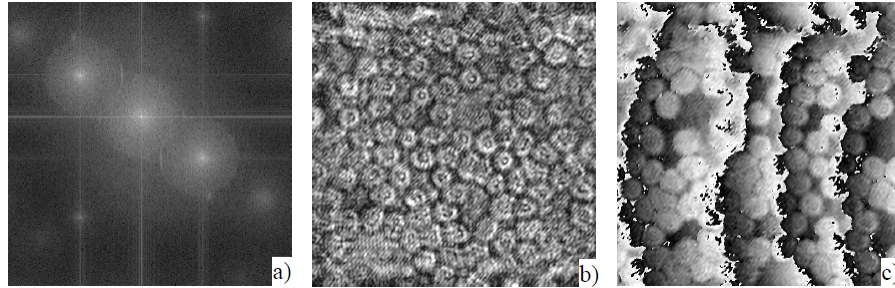


Figura 4.21.: Método de PEA. (a) espectro, (b) imagen de amplitud y (c) imagen de contraste de fase.

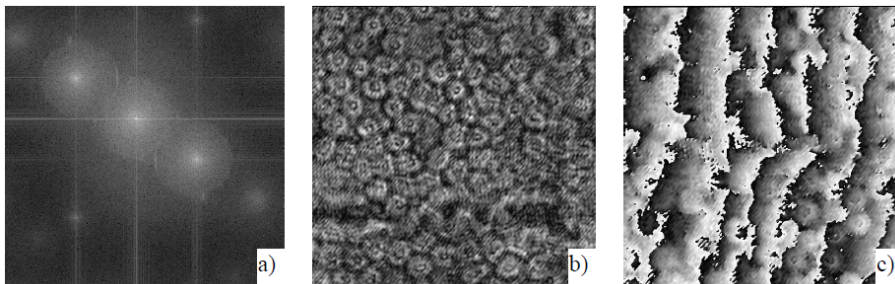


Figura 4.22.: Método de Convolución. (a) espectro, (b) imagen de amplitud y (c) imagen de contraste de fase.

5. Análisis de mapas de fase bidimensionales

Tal como se explicó anteriormente, la holografía provee un método para el registro completo de un frente de onda; esto es su amplitud y su fase. Sin embargo, aún cuando en holografía convencional la fase surge naturalmente del proceso de reconstrucción del holograma, esto no ocurre en holografía digital. Como hemos descrito previamente, en un Microscopio Holográfico Digital la interferencia entre dos ondas coherentes, la onda objeto y la onda de referencia, se registra en un sensor CCD o CMOS. La técnica permite recuperar numéricamente la onda objeto original en amplitud y fase, permitiendo tener acceso a información cuantitativa de gran valor. Sin embargo, se presenta una ambigüedad en la fase cuando las variaciones en la longitud de camino óptico de los objetos exceden una longitud de onda, de modo que las imágenes de fase resultan envueltas módulo 2π . Una estimación de la fase continua reviste crucial importancia para poder extraer la información relevante asociada al objeto. Para nuestros propósitos esta será un mapa de índices de refracción del microorganismo bajo estudio y/o su biovolumen. No obstante, en cualquier caso, la fase llevará la información más importante y deberá estimarse mediante algún método de desenvolvimiento de fase.

Lamentablemente el problema de desenvolvimiento de fase no es trivial, por lo que en la literatura abundan algoritmos que buscan lograr este cometido con mayor o menor éxito según el tipo de señal de la cual surja la fase envuelta. Esto es, si bien existe una amplia gama de algoritmos de desenvolvimiento de fase, todos cuentan con ventajas y desventajas que deben evaluarse al momento de elegir el método adecuado para aplicar en cada caso particular.

Los hologramas que se obtienen por MHD suelen contar con grandes niveles de ruido, ya sea ruido coherente, ruido de *speckle*, y/o ruido debido a partículas de polvo adheridas en los elementos ópticos, entre otros. Esto degrada de manera sustancial la calidad del mapa de fase envuelto, con lo cual la ulterior obtención de la estimación de la fase desenvuelta puede llegar a ser problemática.

El estudio e implementación de algoritmos de desenvolvimiento bidimensionales constituye uno de los objetivos de este trabajo, pues sin un método robusto no es posible alcanzar los otros objetivos planteados, tales como la determinación de biovolumen y la identificación automática de especímenes.

Por lo expuesto es que se realizó un estudio bibliográfico minucioso de los mismos. Del análisis surge que si bien existe una gran cantidad de algoritmos, básicamente

estos pueden categorizarse en dos clases: métodos locales de desenvolvimiento, tales como los métodos camino-dependientes y métodos globales, tales como los métodos de desenvolvimiento por cuadrados mínimos.

En el primer caso el proceso de desenvolvimiento comienza en un punto en particular del mapa y continúa tras la elección sucesiva de un camino con un criterio bien definido y que involucra al entorno de cada punto que se logra desenvolver. Como contraparte, en los métodos globales, se busca desenvolver todos los píxeles del mapa en simultáneo, por lo que abordan el desenvolvimiento como un problema de ajuste o minimización; en este caso, se busca ajustar con el mínimo error posible la derivada de la fase envuelta con la derivada de la estimación.

Ambos métodos tienen sus bondades y limitaciones. La principal ventaja del enfoque global es que mantiene controlados los costos de cálculo permitiendo implementaciones muy rápidas, mientras que para el caso de los métodos de enfoque local, aunque son muchos más lentos y difíciles de depurar, permiten obtener resultados más precisos. En este trabajo se implementan algoritmos de ambas clases, se exhiben los resultados y se analizan las ventajas o desventajas de cada uno. Adicionalmente, se implementa un algoritmo de desenvolvimiento de fase con dos longitudes de onda que busca extraer la información de fase a partir de la información que ofrecen los mapas envueltos con cada longitud de onda.

5.1. Análisis de la fase

El problema del desenvolvimiento de fase es una parte esencial de muchas aplicaciones de procesamiento de señales coherentes. Si bien surge naturalmente en aplicaciones interferométricas, no está restringido sólo a ellas. Está presente en muchas ramas de la Física Aplicada y la Ingeniería, tales como Procesamiento de Imágenes por Resonancia Magnética, Interferometría de Radar de Apertura Sintética, entre otros.

Para cualquier señal real, sea temporal o espacial, unidimensional o bidimensional, la fase debe *extraerse* de la señal misma mediante alguna operación matemática. La fase resulta una *propiedad* de la señal real relacionada con el período en el caso temporal y/o la longitud de onda en el caso espacial y tiene influencia sobre la señal sólo a través de valores de fase que se encuentran entre $\pm\pi$ radianes. En particular en holografía - nuestro caso de estudio - la fase bidimensional se encuentra codificada en el patrón resultante de la interferencia del haz objeto, y del haz de referencia.

Generalmente, la fase está relacionada con alguna magnitud física de interés y que se desea medir. No obstante esta relación no es lineal. En general, en los procesos matemáticos involucrados en la obtención de fase surge la forma «envuelta» ψ de una fase bidimensional subyacente φ . Los algoritmos involucrados modifican la verdadera señal de fase de tal forma que distribuyen los valores en un intervalo de $\pm\pi$ radianes, generando discontinuidades cíclicas y «envolviendo» así la señal. Por ende, la fase

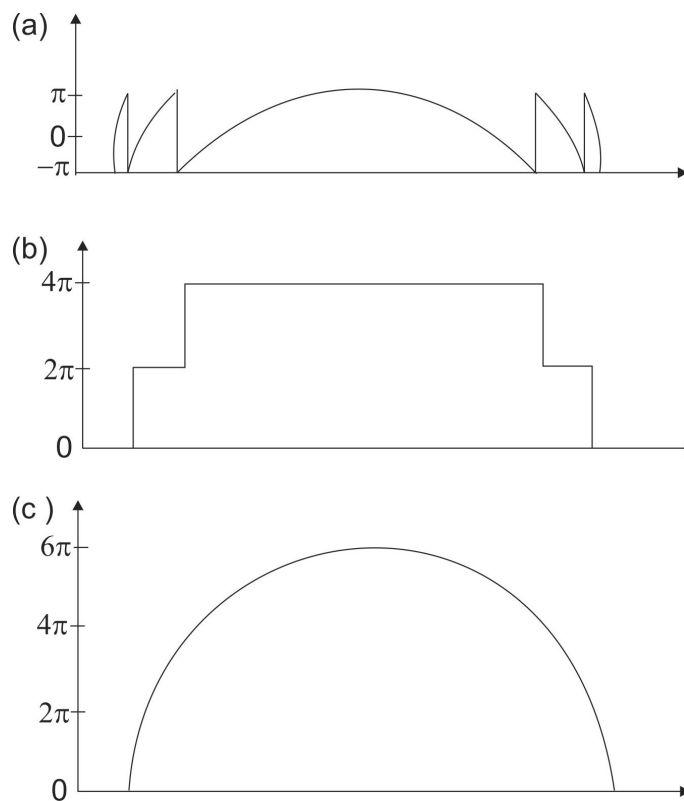


Figura 5.1.: Proceso de desenvolvimiento: a) fase envuelta b) un mapa de saltos c) fase desenvuelta: $c = a + b$.

envuelta debe desenvolverse de alguna manera con el fin de proveer una estimación de la verdadera cantidad física de interés.

Matemáticamente, una función fase desconocida φ resulta envuelta en el intervalo $(-\pi, \pi]$ mediante la siguiente operación:

$$\psi(x, y) = W(\varphi(x, y)) = \varphi(x, y) + 2\pi k(x, y) \quad (5.1)$$

donde W denota al operador «envolver», y $k(x, y)$ es una función entera que envuelve φ de tal modo que $-\pi < \psi \leq \pi$. Así, $\psi(x, y)$ es una función no lineal de $\varphi(x, y)$.

El problema de desenvolvimiento de fase está abocado a la obtención de una estimación $\phi(x, y)$ de la fase $\varphi(x, y)$ a partir de la función envuelta $\psi(x, y)$.

Un ejemplo unidimensional se muestra en la Figura 5.1, en el que a la fase envuelta $\psi(x)$ en a , se le suma la función escalón dada en b (que acumula los saltos 2π para todos los píxeles), y se obtiene la fase desenvuelta $\varphi(x)$ en c .

La implementación de algoritmos de desenvolvimiento de fase suele ser problemática por diversos motivos. Fundamentalmente, el éxito en la estimación de la fase desenvuelta está supeditado por un lado a la suposición de que las señales reales

analógicas al ser muestreadas y convertidas a señales digitales no sufran *aliasing*, y por otro lado, al nivel de ruido de la señal [PG98].

En el dominio continuo, y en ausencia de singularidades, existe una única manera de desenvolver la fase, y la solución de fase desenvuelta es única. Ahora bien, en el caso de la holografía, la señal que resulta de la interferencia de dos haces coherentes es muestreada por la cámara CCD o CMOS que, en última instancia, convierten la señal analógica en una señal digital. Por lo tanto, la señal digital constituye una representación incompleta de la señal real. Así, la fase envuelta que se extrae de la señal muestreada puede resultar imposible de desenvolver.

5.2. La fase en Interferometría

Recordemos que para un arreglo interferométrico, en particular el holograma, la intensidad resultante en el medio fotosensible está dada por la Ecuación 3.1, que reescribimos aquí:

$$I(x, y) = |O|^2 + |R|^2 + 2OR \cos [\varphi_R(x, y) - \varphi_O(x, y)] \quad (5.2)$$

Los dos primeros términos dependen sólo de la intensidad de las ondas, mientras que el tercero depende de la diferencia de fase entre las ondas objeto y referencia $\Delta\varphi = \varphi_R(x, y) - \varphi_O(x, y)$. Se hace evidente, entonces, que en la intensidad del patrón resultante queda almacenada la información pertinente a la diferencia de fase entre las ondas.

Ahora bien, al intentar obtener los valores de fase $\Delta\varphi$ a partir de la distribución de intensidad dada por la Ecuación 5.2, surge un inconveniente debido a la naturaleza de la función coseno. Ésta no es una función uno a uno aunque es par y periódica: $\cos \alpha = \cos [s\alpha + 2\pi N]$ si $s \in \{-1, 1\}$, $N \in \mathbb{Z}$. Por tanto, los valores de fase obtenidos a partir de la distribución de intensidad $I(x, y)$ quedan indefinidos en múltiplos enteros de 2π y en el signo de s .

La determinación de la fase implica la utilización de la inversa de una función trigonométrica. Todas las funciones trigonométricas pueden expresarse en términos de la función arco-tangente, como por ejemplo $\arccos(x) = \arctan[\sqrt{1-x^2}/x]$. La función arco-tangente está definida en el intervalo $[-\frac{\pi}{2}, +\frac{\pi}{2})$. Sin embargo, en la mayoría de los algoritmos diseñados para la evaluación cuantitativa de la fase a partir de patrones de interferencia, el cálculo de la función arco-tangente se realiza a partir de un cociente, cuyo numerador y denominador corresponden al seno y al coseno del argumento respectivamente. Cuando se analizan los signos del numerador y del denominador en forma separada, se observa que existen cuatro combinaciones posibles de signo, que cubren un intervalo $[-\pi, +\pi)$. Por eso decimos que la fase así obtenida está envuelta, pues se presenta con una ambigüedad de signo (que nos impide predeterminar el sentido de aumento o disminución de los valores de fase)

y una indefinición en los múltiplos enteros de 2π . El proceso de desenvolvimiento involucra, la eliminación de los saltos de fase módulo 2π , simplemente sumando y restando cantidades enteras de 2π .

5.3. Desenvolvimiento de fase

5.3.1. Método de desenvolvimiento de fase por cuadrados mínimos

Este algoritmo global relaciona la fase envuelta con la fase desenvuelta (que es la función a obtener) imponiendo la condición de que las derivadas locales de la fase desenvuelta coincidan «lo mejor posible» con las derivadas de la fase envuelta; es decir, la solución es una función cuyas pendientes en cada punto coinciden con las de la fase envuelta. La expresión «lo mejor posible» involucra la noción de *mínimo error*; esto es, que la suma de las diferencias al cuadrado entre los *gradientes* de la solución y los de la fase envuelta se minimice.

Para nuestros propósitos, la fase de interés es una función bidimensional continua del tipo φ_O , que se obtiene a partir de la señal de intensidad $I(x, y)$. Ahora bien, el medio de registro fotosensible muestrea la señal continua, resultando $I(i, j)$ la versión discreta de la función continua $I(x, y)$, con i variando desde 0 a $N - 1$ y j variando desde cero a $M - 1$; $N \times M$ el tamaño del sensor. Asimismo, la estimación de la fase bidimensional es una versión discretizada $\phi_O(i, j)$ de la fase $\varphi_O(x, y)$. Por comodidad, denotaremos $\phi_O(i, j) = \phi_{i,j}$. Por lo tanto el objetivo es obtener una estimación $\phi_{i,j}$ de la fase continua, cuando se conoce la versión envuelta $\psi_{i,j}$.

5.3.1.1. Principios

Supongamos que conocemos la fase módulo 2π de una señal discreta (en nuestro caso de interés, se obtiene a partir del holograma reconstruido), la cual se encuentra dada por $\psi_{i,j}$:

$$\begin{aligned} \psi_{i,j} &= W[\varphi_{i,j}] = \varphi_{i,j} + 2\pi k_{i,j} \quad \text{si } k_{i,j} \in \mathbb{Z} \\ -\pi &< \psi_{i,j} \leq \pi \quad \text{si } i = 0, \dots, N-1 \quad j = 0, \dots, M-1 \end{aligned} \tag{5.3}$$

Queremos determinar los valores de fase continua o desenvuelta en cada punto $\phi_{i,j}$, con el requerimiento de que sus gradientes coincidan con los de $\psi_{i,j}$ en un sentido de cuadrados mínimos. Siguiendo a GHIGLIA Y ROMERO[GR94], los gradientes de $\psi_{i,j}$ se definen simplemente como las diferencias entre puntos adyacentes de la fase envuelta en cada una de las coordenadas rectangulares i y j .

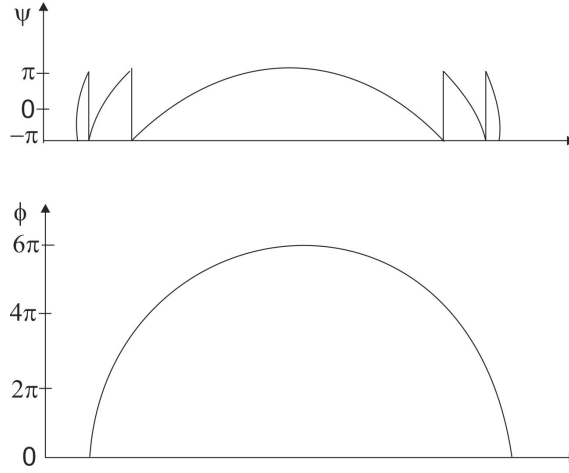


Figura 5.2.: Fase envuelta ψ y la fase desenvuelta ϕ .

Para ilustrar la razón por la que esto tiene sentido, analicemos un ejemplo simple teniendo en cuenta la señal unidimensional dada en la Figura 5.1 y que se muestra nuevamente en la Figura 5.2.

Claramente, las diferencias de ψ entre píxeles adyacentes ($\psi_{i+1} - \psi_i$) coinciden con las diferencias de ϕ entre los mismos píxeles adyacentes ($\phi_{i+1} - \phi_i$), en todos los puntos excepto en aquellos donde ocurre un salto discontinuo de fase para ψ (de valor 2π o -2π). Estos saltos discontinuos pueden atenuarse usando el operador W que envuelve todos los valores de su argumento en el rango $[-\pi, +\pi)$. W opera sumando o sustrayendo un número entero de 2π radianes de su argumento, de acuerdo a Ecuación 5.3. Luego, se computan dos conjuntos de diferencias entre píxeles adyacentes: uno para las coordenadas horizontales i y otro para las coordenadas verticales j ; i.e., se computa el «gradiente» de la fase envuelta en las coordenadas rectangulares x e y ; al resultado se lo envuelve aplicando el operador W . El procedimiento, teniendo en cuenta las condiciones de borde, está dado por las siguientes ecuaciones:

$$\Delta_{i,j}^x = \begin{cases} W(\psi_{i+1,j} - \psi_{i,j}) & \text{si } i = 0, \dots, N-2, \quad j = 0, \dots, M-1 \\ 0 & \text{en c.o.c} \end{cases} \quad (5.4)$$

$$\Delta_{i,j}^y = \begin{cases} W(\psi_{i,j+1} - \psi_{i,j}) & \text{si } i = 0, \dots, N-1, \quad j = 0, \dots, M-2 \\ 0 & \text{en c.o.c} \end{cases} \quad (5.5)$$

El objetivo es minimizar la suma de los cuadrados de los residuos, estos últimos dados por la diferencia entre el gradiente de la función a estimar $\phi_{i,j}$ y el gradiente, cuyas componentes están dadas por la Ecuación 5.4 y la Ecuación 5.5. Matemáticamente:

$$J = \sum_{i=0}^{N-2} \sum_{j=0}^{M-1} \varepsilon^2 = \sum_{i=0}^{N-2} \sum_{j=0}^{M-1} (\phi_{i+1,j} - \phi_{i,j} - \Delta_{i,j}^x)^2 + \sum_{i=0}^{N-1} \sum_{j=0}^{M-2} (\phi_{i,j+1} - \phi_{i,j} - \Delta_{i,j}^y)^2$$

$$(5.6)$$

con ε denotando a cada residuo. La condición necesaria para encontrar puntos críticos de una función (posibles extremos) establece:

$$\delta J = 0 \quad (5.7)$$

Para que se cumpla la Ecuación 5.7 debemos diferenciar cada término de la Ecuación 5.6:

$$\begin{aligned} \delta_1 &= \delta \left(\sum_{i=0}^{N-2} \sum_{j=0}^{M-1} \left(\phi_{i+1,j} - \phi_{i,j} - \Delta_{i,j}^x \right)^2 \right) = \sum_{i=0}^{N-2} \sum_{j=0}^{M-1} a_{i,j} (\delta \phi_{i+1,j} - \delta \phi_{i,j}) \\ \delta_2 &= \delta \left(\sum_{i=0}^{N-1} \sum_{j=0}^{M-2} \left(\phi_{i,j+1} - \phi_{i,j} - \Delta_{i,j}^y \right)^2 \right) = \sum_{i=0}^{N-1} \sum_{j=0}^{M-2} b_{i,j} (\delta \phi_{i,j+1} - \delta \phi_{i,j}) \end{aligned} \quad (5.8)$$

con:

$$\begin{cases} a_{i,j} = 2 \left(\phi_{i+1,j} - \phi_{i,j} - \Delta_{i,j}^x \right) & \text{si } 0 \leq i \leq N-2, \quad 0 \leq j \leq M-1 \\ b_{i,j} = 2 \left(\phi_{i,j+1} - \phi_{i,j} - \Delta_{i,j}^y \right) & \text{si } 0 \leq i \leq N-1, \quad 0 \leq j \leq M-2 \end{cases} \quad (5.9)$$

de modo que :

$$\delta J = 0 \Rightarrow \delta_1 + \delta_2 = 0 \quad (5.10)$$

Si se realiza un corrimiento de subíndices i y j , puede demostrarse que la Ecuación 5.8 es equivalente a:

$$\begin{aligned} \delta_1 &= - \sum_{i=0}^{N-1} \sum_{j=0}^{M-1} (a_{i,j} - a_{i-1,j}) \delta \phi_{i,j} \\ \delta_2 &= - \sum_{i=0}^{N-1} \sum_{j=0}^{M-1} (b_{i,j} - b_{i,j-1}) \delta \phi_{i,j} \end{aligned} \quad (5.11)$$

Donde debe notarse que se hizo un cambio en los límites de la sumatoria. Este cambio implica establecer las siguientes condiciones de borde:

$$a_{i,j} = 0 \quad \text{para } i = -1, \quad i = N-1, \quad 0 \leq j \leq M-1$$

$$b_{i,j} = 0 \quad \text{para } j = -1, \quad j = M-1, \quad 0 \leq i \leq N-1$$

Y con esto, extender la zona en la que quedan definidos $a_{i,j}$ y $b_{i,j}$ a $0 \leq i \leq N-1$, y $0 \leq j \leq M-1$ para ambos coeficientes.

Sustituyendo la Ecuación 5.11 en la Ecuación 5.10, se obtiene:

$$\delta J = - \sum_{i=0}^{N-1} \sum_{j=0}^{M-1} (b_{i,j} - b_{i,j-1} + a_{i,j} - a_{i-1,j}) \delta \phi_{i,j} = 0$$

Suponiendo que la perturbación $\delta\phi_{i,j}$ es arbitraria, para que se cumple la igualdad, en la ecuación anterior debe cumplirse:

$$b_{i,j} - b_{i,j-1} + a_{i,j} - a_{i-1,j} = 0 \quad \text{para } 0 \leq i \leq N-1, \quad 0 \leq j \leq M-1$$

Por último, reemplazando la Ecuación 5.9 en la ecuación anterior y re-acomodando términos se obtiene:

$$(\phi_{i+1,j} - 2\phi_{i,j} + \phi_{i-1,j}) + (\phi_{i,j+1} - 2\phi_{i,j} + \phi_{i,j-1}) = \rho_{i,j} \quad (5.12)$$

siempre que:

$$\rho_{i,j} = \Delta_{i,j}^x - \Delta_{i-1,j}^x + \Delta_{i,j}^y - \Delta_{i,j-1}^y \quad (5.13)$$

Este es el conjunto de ecuaciones normales que deben resolverse para encontrar la solución ϕ que minimiza la Ecuación 5.6 por cuadrados mínimos. Esta provee de la relación entre los datos que pueden obtenerse de la fase envuelta y los valores de fase desenvuelta.

Puede demostrarse que la ecuación Ecuación 5.12 es la versión discreta de la Ecuación de Poisson:

$$\nabla^2 \phi(x, y) = \rho(x, y) \quad (5.14)$$

con $\nabla^2 \phi(x, y) = \frac{\partial^2 \phi(x, y)}{\partial x^2} + \frac{\partial^2 \phi(x, y)}{\partial y^2}$ el *Laplaciano* de ϕ y $\rho(x, y)$ la versión continua de $\rho_{i,j}$.

El objetivo es encontrar la función ϕ que verifica el conjunto de ecuaciones diferenciales dados por la Ecuación 5.12 o por la Ecuación 5.14. Ciertamente, no conocemos *a-priori* la forma funcional que tendrá ϕ , con lo cual no contamos con un modelo matemático al cual ajustarlo por cuadrados mínimos. Una de las alternativas posibles para resolver la Ecuación 5.12 es de manera iterativa, inicializando $\phi_{i,j}$ en cero y luego actualizar su valor iterativamente como sigue:

$$\phi_{i,j} = \frac{(\phi_{i+1,j} + \phi_{i-1,j} + \phi_{i,j+1} + \phi_{i,j-1}) - \rho_{i,j}}{4}$$

El procedimiento se itera hasta que converge, aunque implica un costo computacional elevado. Como contraparte, puede aplicarse una transformada y operar en el espacio de frecuencias.

Una manera de abordar el problema consiste en suponer que cualquiera sea la forma funcional de la solución ϕ , ésta puede expandirse como una combinación lineal de funciones más simples; generalmente se opta por la expansión en término de senos y cosenos usando la Transformada de Fourier o por la expansión en términos sólo de cosenos, usando la *Transformada Coseno*.

En particular, vamos a suponer que ϕ puede expandirse como una suma de distintas señales cosenoidales con distintas frecuencias y amplitudes. Matemáticamente, esta

expansión en términos de cosenos conduce a lo que se conoce como una *Transformada Coseno Discreta*, y que a continuación se define.

Sea $x_{i,j}$ una señal bidimensional cualquiera. La *Transformada Discreta del Coseno* (DCT) $x_{i,j}$ se define:

$$C_{n,m} = \begin{cases} \left(\sum_{i=0}^{N-1} \sum_{j=0}^{M-1} 4x_{i,j} \cos \left[\frac{\pi}{2N} n (2i+1) \right] \dots \right) & \text{si } \begin{pmatrix} 0 \leq n \leq N-1 \\ 0 \leq m \leq M-1 \end{pmatrix} \\ 0 & \text{en c.o.c} \end{cases} \quad (5.15)$$

Por lo que $x_{i,j}$ se expande en términos de una sumatoria de cosenos de distintas frecuencias, ponderados por los coeficientes $C_{n,m}$.

Por su parte, la Transformada Inversa (IDCT) queda definida:

$$x_{i,j} = \begin{cases} \left(\frac{1}{NM} \sum_{i=0}^{N-1} \sum_{j=0}^{M-1} w_1(n) w_2(m) C_{n,m} \dots \right) & \text{si } \begin{pmatrix} 0 \leq i \leq N-1 \\ 0 \leq j \leq M-1 \end{pmatrix} \\ 0 & \text{en c.o.c} \end{cases} \quad (5.16)$$

Con $w_1(n)$ y $w_2(m)$ definidos de la siguiente manera:

$$\begin{aligned} w_1(0) &= \frac{1}{2} \\ w_1(n) &= 1 \quad \text{si } 1 \leq n \leq N-1 \\ w_2(0) &= \frac{1}{2} \\ w_2(m) &= 1 \quad \text{si } 1 \leq m \leq M-1 \end{aligned}$$

Para nuestros propósitos, se expande la solución buscada $\phi_{i,j}$ de acuerdo a la Ecuación 5.16:

$$\phi_{i,j} = \left(\frac{1}{NM} \sum_{i=0}^{N-1} \sum_{j=0}^{M-1} w_1(n) w_2(m) \hat{\phi}_{n,m} \dots \right) \quad \text{para } \begin{pmatrix} 0 \leq i \leq N-1 \\ 0 \leq j \leq M-1 \end{pmatrix}$$

Esto es, nuestra solución $\phi_{i,j}$ queda expresada como una combinación lineal de cosenos de distintas frecuencias, ponderados por los coeficientes $\hat{\phi}_{i,j}$ dados por la Transformada Coseno (DCT) de $\phi_{i,j}$.

De manera análoga, $\rho_{i,j}$ queda expresado como:

$$\rho_{i,j} = \left(\frac{1}{NM} \sum_{i=0}^{N-1} \sum_{j=0}^{M-1} w_1(n) w_2(m) \hat{\rho}_{n,m} \dots \right) \quad \text{para } \begin{pmatrix} 0 \leq i \leq N-1 \\ 0 \leq j \leq M-1 \end{pmatrix}$$

Si se expanden de manera similar cada uno de los términos restantes del conjunto de ecuaciones normales dados por la Ecuación 5.12, se obtiene:

$$\left(\begin{array}{c} \frac{2}{NM} \sum_{i=0}^{N-1} \sum_{j=0}^{M-1} w_1(n) w_2(m) \hat{\phi}_{n,m} \dots \\ \cdot \cos\left(\frac{\pi}{2N}n(2i+1)\right) \cos\left(\frac{\pi}{2M}m(2j+1)\right) \dots \\ \left(\cos\left(\frac{\pi n}{N}\right) - 1 + \cos\left(\frac{\pi m}{M}\right) - 1\right) \end{array} \right) = \left(\begin{array}{c} \frac{1}{NM} \sum_{i=0}^{N-1} \sum_{j=0}^{M-1} w_1(n) w_2(m) \hat{\rho}_{n,m} \dots \\ \cdot \cos\left(\frac{\pi}{2N}n(2i+1)\right) \dots \\ \cdot \cos\left(\frac{\pi}{2M}m(2j+1)\right) \end{array} \right)$$

Es claro que, para que los dos miembros sean iguales debe cumplirse que:

$$\hat{\rho}_{n,m} = 2\hat{\phi}_{n,m} \left(\cos\left(\frac{\pi n}{N}\right) + \cos\left(\frac{\pi m}{M}\right) - 2 \right)$$

Y por lo tanto:

$$\hat{\phi}_{n,m} = \frac{\rho_{n,m}}{2 \left(\cos\left(\frac{\pi n}{N}\right) + \cos\left(\frac{\pi m}{M}\right) - 2 \right)} \quad \text{si } n : 1 \leq n \leq N-1, \quad m : 1 \leq m \leq M-1 \quad (5.17)$$

Vemos que el denominador de esta expresión se anula para $n = 0$ y $m = 0$, por lo cual se establece:

$$\hat{\phi}_{0,0} = \hat{\rho}_{0,0} \quad (5.18)$$

La fase desenvuelta $\phi_{i,j}$ se obtiene fácilmente haciendo la Transformada Coseno Inversa (IDCT) a la Ecuación 5.17 y a la Ecuación 5.18. Esta es la solución de mínimos cuadrados buscada.

En resumen, de la fase envuelta $\psi_{i,j}$, se obtienen $\Delta_{i,j}^x$ y $\Delta_{i,j}^y$ de acuerdo con la Ecuación 5.4 y la Ecuación 5.5. Luego a partir de la Ecuación 5.15 se obtiene ρ_{ij} . Por ende, para obtener la solución basta con:

1. Efectuar la Transformada Coseno Directa Discreta (DCT) a ρ_{ij} para obtener $\hat{\rho}_{i,j}$.
2. Operar con cada uno de los coeficientes $\hat{\rho}_{i,j}$ obtenidos, de acuerdo a Ecuación 5.17, y así obtener $\hat{\phi}_{i,j}$.
3. Por último, anti-transformar $\hat{\phi}_{i,j}$ para obtener la solución de mínimos cuadrados $\phi_{i,j}$.

5.3.1.2. Resultados

La implementación del procedimiento detallado en el apartado anterior, se ejemplifica con imágenes de contraste de fase obtenidas por MHD. En este caso particular, se trata de la que surge de un holograma de una muestra de agua en la que se

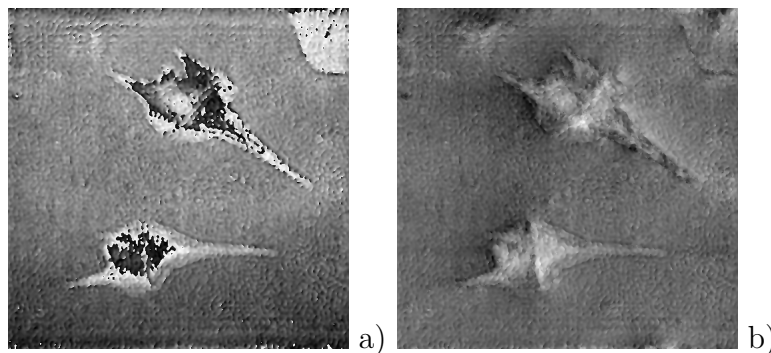


Figura 5.3.: Mapa de fase de un holograma con dos microalgas de la especie *Ceratium hirundinella* a) mapa envuelto; b) mapa desenvuelto usando el algoritmo de cuadrados mínimos.

encuentran dos microalgas de la especie *Ceratium hirundinella*. El montaje experimental es el que se describió en el Capítulo 4. En este caso, el registro se realizó con una cámara CCD, se usaron objetivos de 10X, y la distancia de reconstrucción fue $d = 0,05m$. En la Figura 5.3 se muestra la fase envuelta y el mapa continuo ϕ obtenido utilizando el método PEA descrito en la Subsección 3.2.2.

Se advierte que si bien el método arroja resultados aceptables a simple vista, contiene algunos artefactos e imprecisiones. El fondo de la imagen, que representa el medio acuoso en el que las algas se encuentran inmersas, es de un nivel de gris aproximadamente uniforme, tal como se espera. Cada microalga introduce un retardo de fase a la luz que la atraviesa por poseer un índice de refracción mayor que el medio. Esto se verifica para la microalga inferior en la que se advierte que cada píxel dentro del área de la microalga presenta un nivel de gris superior al nivel de gris de fondo. Por el contrario, la microalga que se encuentra en la región superior del mapa presenta zonas con niveles de gris inferiores al fondo, lo que daría cuenta de zonas de índice de refracción menor. Desde el punto de vista físico, esto podría corresponder a minúsculas burbujas de aire. Sin embargo, dado que en los bordes de esa microalga también se aprecian niveles de gris más bajos, la hipótesis más factible es que se trate de un problema asociado al método de desenvolvimiento.

Para descartar otras variables que puedan tener injerencia en el desempeño del método, se ensaya con distintos hologramas y con distintos filtros aplicados al orden de interés. Recordemos que el método PEA requiere de la aplicación de un filtro en el espacio de frecuencias para recuperar el frente de onda completo. Del análisis realizado, se concluye que la performance del método depende fuertemente del tamaño y tipo de filtro aplicado. El estudio correspondiente se reserva para el Capítulo 6; no obstante, a continuación se ilustra la fase módulo 2π y la fase continua que se obtiene cuando se aplica un filtro con un parámetro $a = 1,2$ y se usa una máscara Kaiser con un parámetro $\beta = 5$ (Ver Subsección 6.3.2 y Subsección 6.3.3). En la Figura 5.4a) se advierte que la versión envuelta de la fase se ve modificada y como consecuencia, en b), la fase continua también, con sólo ligeras mejoras respecto a

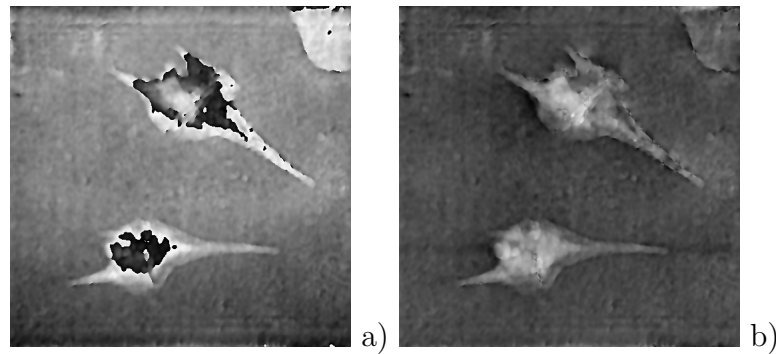


Figura 5.4.: a) Fase envuelta; b) Fase continua

la de la Figura 5.3.

5.3.2. Desenvolvimiento mediante Mapas de Calidad

Generalmente el fracaso de los algoritmos de desenvolvimiento de fase globales reside en la preponderante influencia del ruido en el resultado final. Los algoritmos de desenvolvimiento globales son fuertemente susceptibles al ruido. En particular, la solución por cuadrados mínimos se ve afectada por valores atípicos y ruido, tal como se ve afectado un promedio aritmético; un valor atípico «empuja» la estimación de modo que se satisfaga la condición de mínimo error cuadrático. Es por esto que los resultados que arroja el método pueden no representar en absoluto la fase subyacente, con la consecuente imposibilidad de extraer de ellos la información física de interés.

Una alternativa para resolver este problema la ofrecen los algoritmos de desenvolvimiento locales, que desenvuelven cada elemento de la señal de fase envuelta de a uno por vez, siguiendo un camino en particular. El éxito de los mismos queda supeditado a la elección correcta del camino a seguir. Sucede que en ciertas regiones aisladas, los valores de la fase desenvuelta dependen del camino seleccionado. El error que se produce al integrar sobre estas regiones se propaga al resto de la imagen a lo largo del camino de integración. Este es uno de los motivos por los cuales no es aconsejable efectuar desenvolvimientos por filas o por columnas para una imagen bidimensional; es más, si así se realizara, los resultados serían erróneos en la mayor parte de los casos .

Como solución a este problema en la literatura se plantean distintas alternativas [PG98]. Una de ellas consiste en identificar las zonas de inconsistencia de fase o residuos. Para ello se puede sumar las diferencias entre puntos consecutivos de la fase envuelta a lo largo del camino cerrado más corto, para todo el conjunto de valores de fase. Los valores de fase cuyos caminos cerrados arrojan resultados distintos de cero son etiquetados como inconsistentes. Este análisis se repite para la totalidad de los valores de fase, dando como resultado una matriz denominado *mapa de inconsistencias* en el cual quedan indicadas las posiciones de las inconsistencias. La localización

de las inconsistencias y su densidad proveen una indicación de la complejidad del problema de desarrollo.

Otra opción consiste en definir un *mapa de calidad* o *quality map*. Los mapas de calidad son matrices de las mismas dimensiones que el de la fase envuelta cuyos valores definen la calidad o bondad de cada valor del mapa en relación al problema de desarrollo, es decir le otorga a cada punto un «peso» relacionado con la confianza que se tiene en la exactitud del correspondiente valor en el mapa de fase.

5.3.2.1. Mapas de calidad

Un mapa de calidad útil resulta el *mapa de correlación*, en la bibliografía definido como la magnitud de los valores complejos de las señales obtenidas por interferometría de radar de apertura sintética o *IFSAR*. El mapa de correlación es importante puesto que es considerado como el mejor estimador de la calidad de los datos de fase que se extraen por IFSAR. En general las zonas *decorrelacionadas* o ruidosas de la fase, se corresponden con las regiones de menor calidad (o más oscuras) del mapa de correlación.

Existen otros mapas de calidad que pueden derivarse directamente de los datos disponibles de la fase. Un ejemplo es la *varianza del gradiente de la fase*, que se define de la siguiente manera:

$$z_{mn} = \frac{\sqrt{\sum_{i,j} (\Delta_{ij}^x - \overline{\Delta_{mn}^x})^2} + \sqrt{\sum_{i,j} (\Delta_{ij}^y - \overline{\Delta_{mn}^y})^2}}{k^2}$$

donde para cada suma los índices (i, j) varían en una ventana de $k \times k$ centrada en el píxel central (m, n) ; Δ_{ij}^x y Δ_{ij}^y son las derivadas parciales de la fase envuelta (componentes del gradiente), mientras que $\overline{\Delta_{mn}^x}$ y $\overline{\Delta_{mn}^y}$ son los promedios de estas derivadas parciales en la ventana de $k \times k$. La varianza del gradiente de la fase es por lo general la medida más confiable de la calidad de la fase cuando no se cuenta con el mapa de correlación.

Otra alternativa es tomar el *gradiente de fase máximo* que mide la magnitud del gradiente de fase más alto y se define para cada píxel como el máximo de estos dos valores:

$$\max(|\Delta_{ij}^x|), \quad \max(|\Delta_{ij}^y|)$$

donde el máximo se evalúa dentro de una ventana de $k \times k$ constituida por vecinos a un determinado píxel. Este mapa resulta adecuado como medida de calidad puesto que en las regiones de fase ruidosas, los gradientes tienden a ser mayores. El mapa de calidad es la negación del mapa de gradiente máximo, de modo que exista una relación directa entre valores altos del mapa con calidad alta y preferencia para desarrollar el valor de fase asociado.

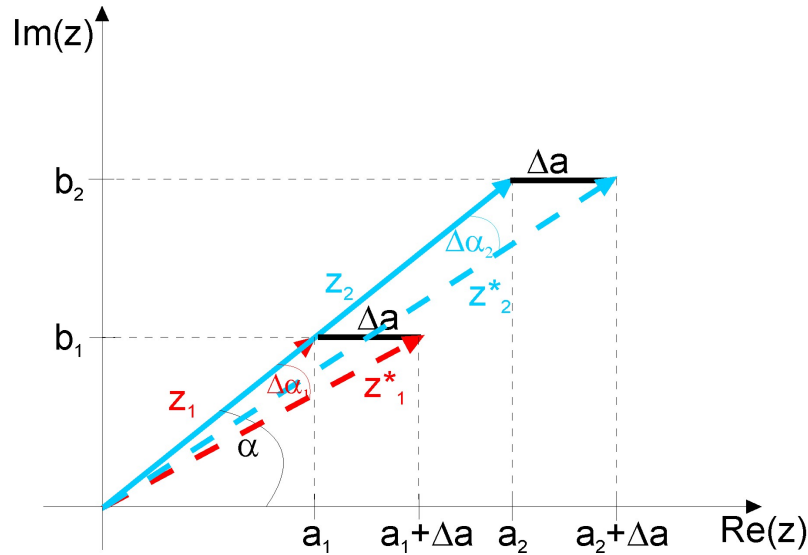


Figura 5.5.: El módulo como mapa de calidad y su impacto en los errores de fase.

5.3.2.2. Uso del módulo del holograma como mapa de calidad

En MHD contamos con un mapa de calidad que emerge naturalmente de la técnica holográfica: la imagen del módulo. Esta última, obtenida de la reconstrucción, denota la cantidad de luz que llegó al sensor en cada punto, dando cuenta de la cantidad de luz que absorbe el espécimen. Los motivos por los cuales el módulo constituye un mapa de calidad adecuado se evidencian en la Figura 5.5, una representación gráfica de dos números complejos con distinto módulo e idéntica fase, donde la distancia de los puntos al origen representan el módulo y el ángulo con el eje real, la fase:

$$z_1 = a_1 + ib_1; |z_1| = \sqrt{a_1^2 + b_1^2}; \alpha = \arctan \frac{b_1}{a_1}$$

$$z_2 = a_2 + ib_2; |z_2| = \sqrt{a_2^2 + b_2^2}; \alpha = \arctan \frac{b_2}{a_2}$$

Cuando, como en el caso de z_1 , el módulo es pequeño, una ligera modificación en el valor de la parte real Δa y/o imaginaria Δb puede perturbar erráticamente la fase asociada. Por lo contrario, las regiones con módulo alto, como es el caso de z_2 , se ven sólo ligeramente perturbadas para idénticas variaciones Δa y Δb . En la Figura 5.5 se ha ilustrado el caso en el cual se modifica ligeramente la parte real de z_1 y z_2 en Δa , perturbando en $\Delta\alpha_1$ y $\Delta\alpha_2$ las fases respectivas, siendo $\Delta\alpha_1 > \Delta\alpha_2$.

En el contexto de esta tesis, se utilizan muestras de especímenes esencialmente transparentes. Bajo buenas condiciones de iluminación, las imágenes de contraste de amplitud (módulo) presentan valores altos en el fondo y en el interior de cada

espécimen, y valores bajos en los bordes de los especímenes y en zonas donde se encuentran partículas opacas propias del medio, que es donde los algoritmos suelen fallar. Por tal motivo, al tomar el módulo como mapa de calidad se obtiene una correlación (o mapa de correlación) entre los valores altos de módulo con los valores más aconsejables para desenvolver la fase; lo que lo convierte en el mapa de calidad por excelencia. Para evitar aún más algunos errores del proceso de desenvolvimiento, se propone aplicar una máscara de desenfoque al módulo del holograma reconstruido, particularmente un filtro gaussiano. El motivo de esta elección reside en que en el módulo del holograma reconstruido los bordes de los especímenes resultan bien definidos y los ruidos muy notorios generando saltos muy abruptos. La aplicación de un filtro gaussiano se traduce en un desenfoque incoherente, esfumando bordes y ruido y suavizando la imagen de módulo en su conjunto.

5.3.2.3. Método de desenvolvimiento

El método de desenvolvimiento por mapas de calidad es un algoritmo camino dependiente en el cual el camino de integración sigue los píxeles de calidad alta y evita aquellos de calidad baja, guiado por el mapa de calidad elegido.

El algoritmo parte del punto más iluminado del mapa de calidad, esto es el punto de mayor calidad y añade sus vecinos al conjunto *vecinos* (generalmente es un conjunto de 4 vecinos). Luego examina los vecinos, selecciona el píxel con mejor calidad entre los que están en *vecinos* y lo desenvuelve. Luego añade el píxel al conjunto de píxeles desenvueltos, y añade los vecinos de este píxel al conjunto *vecinos* (siempre que los mismos no estén desenvueltos). Se repite esta operación hasta que no se añaden nuevos píxeles al conjunto *vecinos*, lo que significa que todo el mapa ha sido procesado. Este procedimiento se gráfica en la Figura 5.6:

- (a) los píxeles azules son los que han sido desenvueltos y los píxeles celestes son los que integran el conjunto de píxeles aledaños,
- (b) se evalúa el mapa de calidad para escoger el mejor de los aledaños (en rojo)
- (c) se aplica el desenvolvimiento en el píxel escogido,
- (d) se añaden los vecinos del píxel desenvuelto al conjunto de píxeles vecinos.

En áreas correspondientes a píxeles de alta calidad, la región de píxeles desenvueltos crece hasta que sólo restan los píxeles de baja calidad. El algoritmo sigue entonces el camino de los píxeles de mayor calidad a través de la región de baja calidad hasta que se encuentra con la siguiente región de alta calidad. De esta manera, todos los píxeles de alta calidad se desenvuelven primero y los de baja calidad al último. Lo que minimiza el impacto acumulado de los errores de desenvolvimiento.

5.3.2.4. Resultados

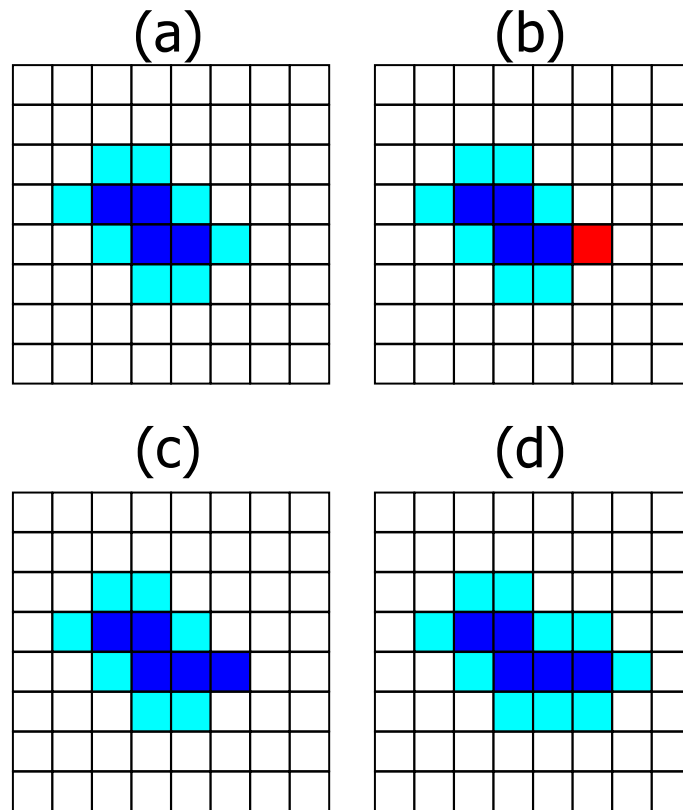


Figura 5.6.: Ejemplo de la aplicación de un paso en donde a) los píxeles azules son los que ya han sido desenvueltos, los celestes son los que integran el conjunto de los vecinos; el rojo en b) es el escogido para ser desenvuelto en el siguiente paso ilustrado en c). En d) se muestra el nuevo conjunto de vecinos.

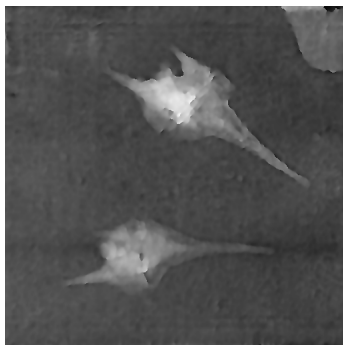


Figura 5.8.: Fase desenvuelta usando el algoritmo por mapa de calidad modificando tamaño y dureza de filtro.

La Figura 5.7 muestra la fase desenvuelta del mismo holograma usado en la sección anterior, con los mismos parámetros de reconstrucción y el mismo filtro utilizado. Por lo tanto, la fase envuelta coincide con la representada en la Figura 5.3a). Se observa que el algoritmo claramente falla en la estimación del retardo de fase introducido por la microalga superior.

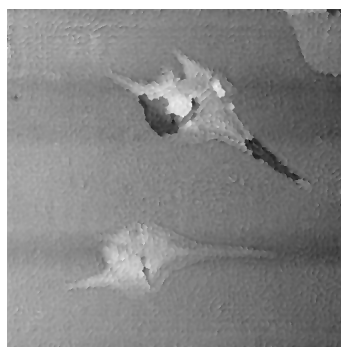


Figura 5.7.: Mapa de fase desenvuelto usando el algoritmo de camino por Mapas de calidad.

Ahora bien, si se modifica el filtro con los mismos parámetros que el de la Figura 5.4, se obtiene como resultado el mapa que se ilustra en la Figura 5.8.

En este caso, se advierten sólo algunos píxeles donde el algoritmo falla probablemente relacionados con las regiones de baja calidad del mapa de calidad. Debido a la naturaleza del método, este puede proporcionar mapas de fase perturbados por algunos artefactos. En la mayoría de nuestros experimentos estas ligeras ambigüedades no afectan la determinación del biovolumen, uno de los objetivos de esta tesis.

5.3.3. Filtro de la mediana para disminución de ruido

La mayoría de los métodos de desarrollo no son robustos ante la presencia de ruido. Los métodos aquí ensayados no son la excepción, aunque el método de cuadrados mínimos es especialmente susceptible al ruido presente en la fase envuelta, ya que en este último caso, la calidad de la estimación de la fase desenvuelta se altera de modo considerable en una escala global.

La solución a esta problemática no es trivial; por un lado se desea que el algoritmo de desarrollo conserve *los bordes* del espécimen y, al mismo tiempo, se

desea eliminar, al menos parcialmente, valores atípicos ya que son los principales responsables de los errores en la estimación de la función solución. Para lograr esto, se propone aplicar un *filtro espacial local* al holograma reconstruido que satisfaga estos requerimientos. En este sentido, el filtro de la mediana resulta adecuado y por lo tanto es el elegido en nuestras aplicaciones.

Un filtro espacial consiste en un procesamiento que se aplica a cada punto de una imagen de acuerdo a los valores del entorno de ese punto, siendo ese punto el centro del entorno (x, y) . Esto es, se define un punto centro (x, y) , se realiza una operación matemática que involucra a todos los píxels vecinos alrededor del centro; el resultado de la operación se lo define como la «respuesta» del proceso en *ese* punto. Luego, el proceso se repite en cada punto de la imagen. El procedimiento de mover el *punto centro*, crea nuevos entornos o vecindarios, uno por cada píxel en la imagen que se desea procesar.

El filtro de la mediana es un filtro espacial *no lineal*, es decir, su respuesta está basada en ordenar los píxels contenidos en un entorno y luego reemplazar el valor del centro con el valor de alguno de los píxels vecinos con un criterio particular. En el caso de la mediana, se reemplaza el valor del centro por el percentil 50 cuando se ordenan los píxels del entorno de menor a mayor. Los valores atípicos no coinciden por lo general con el percentil 50, de modo que los mismos pueden eliminarse al aplicar el filtro al campo reconstruido; simultáneamente, dada la naturaleza del filtro, los bordes se conservan.

Para nuestros propósitos, un filtro de la mediana, típicamente de tamaño 5×5 , se aplica sobre el campo reconstruido; i.e., simultáneamente sobre la parte real y la parte imaginaria. El filtro es lo suficientemente pequeño como para eliminar ruidos y no alterar considerablemente la información de interés, conservando los bordes. Luego, se calcula la fase envuelta y se aplica el algoritmo de desenvolvimiento por cuadrados mínimos.

Un resultado ilustrativo se muestra en la Figura 5.9. Claramente, el ruido y algunos artefactos de la estimación de la fase desenvuelta se eliminan y se obtienen mapas continuos más suaves y menos ruidosos.

5.4. Método con dos longitudes de onda

Hasta aquí hemos expuesto en particular dos algoritmos de desenvolvimiento de fase para recuperar la fase sin ambigüedad, ambos abordados desde dos perspectivas claramente diferentes. No obstante, bajo condiciones experimentales ruidosas o cuando los objetos presentan grandes variaciones morfológicas, tales como saltos, o superficies con grandes variaciones en textura, dichos algoritmos suelen fallar. En esta sección, proponemos usar dos longitudes de onda para remover dichas discontinuidades. La técnica consiste en registrar dos hologramas consecutivos variando la longitud de onda de un láser de Argón-Kriptón sintonizable. Luego, los saltos o

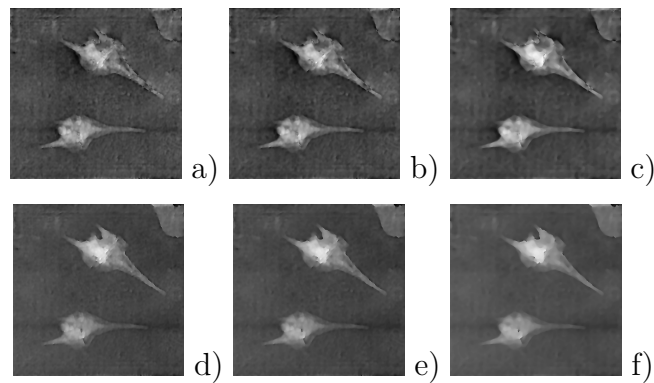


Figura 5.9.: Fases desenvueltas: usando cuadrados mínimos a) sin aplicar el filtro de la mediana, aplicando filtro mediana con una ventana de b) 5x5 píxeles, c) 10x10 píxeles; usando mapa de calidad d) sin aplicar filtro mediana; aplicando filtro mediana con una ventana de e) 5x5 píxeles, f) 10x10 píxeles

discontinuidades en los mapas de fase, que resultan al reconstruir los hologramas con la longitud de onda correcta, no ocurren en los mismos lugares para longitudes de onda diferentes. Se presenta un método que permite desenvolver la fase envuelta haciendo uso de un mapa guía que hemos denominado *Mapa diferencial Sintético de Fase* que combina la información contenida en ambos mapas. Se muestran los resultados obtenidos en hologramas de microalgas y se compara con los mapas de fase continuos obtenidos al aplicar métodos corrientes de desenvolvimiento de fase.

5.4.1. Introducción

Por años se ha sabido que mientras mayor sea la longitud de onda empleada en el registro holográfico, menor cantidad de franjas resultarán sobre un dado objeto, reduciendo así el número de ambigüedades de fase módulo 2π en la imagen de fase. No obstante, para lograr reducir de manera notable el número de discontinuidades se requiere de la utilización de fuentes de luz infrarrojas en lugar de luz visible. Y-Y CHENG y J. C. WYANT [CW84, CW85] mostraron que pueden usarse dos o más longitudes de onda del espectro visible para producir una *longitud de onda de batido* mayor. Idealmente, si podemos registrar un holograma con dos longitudes de onda, tal que la longitud de onda de batido sea tal que no existan ambigüedades módulo 2π en el mapa de fase, los algoritmos de desenvolvimiento no serían necesarios. La idea es extender el rango de medidas de fase con respecto a la que resulta al usar una única longitud de onda.

Existen diversos métodos reportados en la literatura [GDK03, KKL08, KMZ⁺, KMZ⁺11] para resolver las ambigüedades 2π usando dos longitudes de onda. En términos generales, se registran dos hologramas digitales con dos longitudes de onda λ_1 y λ_2 , y se reconstruye cada uno de ellos con la longitud de onda correspondiente. Luego, a partir de las amplitudes complejas del campo reconstruido Ψ_{λ_1} y Ψ_{λ_2} , se

obtienen los dos mapas de fase módulo 2π correspondientes a λ_1 y λ_2 :

$$\begin{aligned}\phi_{\lambda_1} &= \arctan \frac{\text{Im}\Psi_{\lambda_1}}{\text{Re}\Psi_{\lambda_1}} \\ \phi_{\lambda_2} &= \arctan \frac{\text{Im}\Psi_{\lambda_2}}{\text{Re}\Psi_{\lambda_2}}\end{aligned}\tag{5.19}$$

La resta punto a punto de ambos mapas $\Delta\phi_{12} = \phi_1 - \phi_2$ contiene numerosas discontinuidades 2π . Sin embargo, si se suma 2π siempre que $\Delta\phi_{12} < 0$, se obtiene un nuevo mapa de fase con un mayor rango libre de discontinuidades:

$$\Delta\phi_{12} = \begin{cases} \phi_{\lambda_1} - \phi_{\lambda_2} & \text{si } \phi_{\lambda_1} \geq \phi_{\lambda_2} \\ \phi_{\lambda_1} - \phi_{\lambda_2} + 2\pi & \text{si } \phi_{\lambda_1} < \phi_{\lambda_2} \end{cases}\tag{5.20}$$

Este mapa de fase es equivalente a la distribución de fase que se obtendría de un holograma registrado con una *longitud de onda de batido* $\Lambda_{12} = \lambda_1\lambda_2/|\lambda_1 - \lambda_2|$. Se advierte que mientras más parecidas sean las longitudes de onda con las que se registra el holograma, mayor es la longitud de onda de batido, y menores las discontinuidades. En este sentido, y con la elección correcta de las longitudes de onda, con este método puede lograrse, al menos teóricamente, una resolución axial arbitrariamente grande comparada con las longitudes de onda involucradas de modo que desaparezcan las discontinuidades módulo 2π . Con ello, el proceso de desenvolvimiento se hace innecesario.

El método, sin embargo, cuenta con una limitación importante y es que amplifica cualquier ruido de fase. Suponiendo que el mapa de fase de una determinada longitud de onda ϕ_m contiene ruido de fase $2\pi\epsilon_m$, el ruido en el mapa diferencia ϕ_{12} será $2\pi\epsilon_{12} = 2\pi(\epsilon_1 + \epsilon_2)$. *Gass et al.* [GDK03] proponen reducir el ruido del mapa $\Delta\phi_{12}$ al nivel equivalente al del mapa de fase correspondiente a una sola longitud de onda, ϕ_1 o ϕ_2 . Si bien el método arroja resultados con evidentes mejoras en la reducción de ruido, en este trabajo se ha optado por enfocar el problema desde un punto de vista ligeramente diferente, que se expone en la siguiente sección. Luego, como alternativa se propone obtener el mapa de fase continuo a partir de la información que proveen la derivada de los mapas de fase $d\phi_1$ y $d\phi_2$, en lugar de $\Delta\phi_{12}$.

5.4.2. Propuesta para la reducción de ruido

De la Ecuación 5.20 se sigue que de la resta de los mapas de fase envueltos surge un mapa equivalente a la distribución de fase que se obtendría de un holograma registrado con una *longitud de onda de batido* mayor a cualquiera de las otras longitudes de onda. Para ejemplificar, consideremos la Figura 5.10a) que ilustra el perfil $\Delta\phi_{12}$ que se obtiene al operar según la Ecuación 5.20. Como consecuencia, se obtiene un mapa con rango mayor libre de discontinuidades, equivalente al obtenido con una longitud de onda de batido mayor; al mismo tiempo, el ruido se ve amplificado. La propuesta de *Gass et al.* [GDK03] para disminuir el ruido, consiste en la aplicación

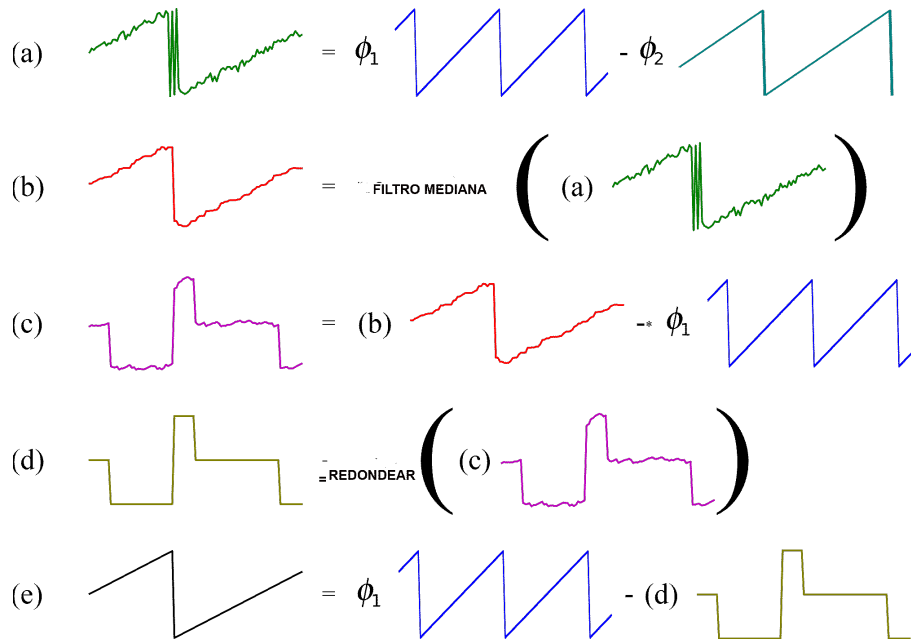


Figura 5.10.: Ilustración del algoritmo para extender la longitud de onda sintética sin aumentar el ruido final.

de una serie de operaciones matemáticas tanto sobre el mapa $\Delta\phi_{12}$ como sobre el mapa de fase envuelto para una longitud de onda, digamos ϕ_1 . Como resultado, se alcanza un nivel de ruido equivalente al del mapa ϕ_1 . Sin embargo, el método falla cuando el ruido del mapa de fase $\Delta\phi_{12}$ es mayor al de un medio de λ_1 . Como alternativa, en este apartado se propone un método que se basa en las propiedades de congruencia y en la aplicación de un filtro mediana.

El algoritmo seguido se ilustra en la Figura 5.10b), c), d) y e). Para ello:

1. Se aplica un filtro de la mediana sobre $\Delta\phi_{12}$. El tamaño de la ventana puede ser tan grande como se desee; el tamaño típico es de $[3 \times 3]$. De cualquier modo, se preservará el detalle de la fase original ϕ_1 y no de $\Delta\phi_{12}$. El efecto resultante se aprecia en la Figura 5.10b), donde han desaparecido los numerosos picos oscilantes originalmente presentes en $\Delta\phi_{12}$.
2. Sobre el perfil obtenido, se resta ϕ_1 con la metodología propuesta en la Subsección 6.2.3 y se obtiene la curva representada en la Figura 5.10c).
3. El ruido remanente se elimina redondeando los valores al congruente más cercano, cuyo resultado se exhibe en la Figura 5.10d).
4. Por último, se sustrae del resultado obtenido, el de la fase original ϕ_1 , tal como se ilustra en la Figura 5.10e). Se obtiene así el nivel de ruido presente en ϕ_1 en un mapa que presenta el mismo número de discontinuidades de fase que las que se obtendrían con una longitud de onda de batido.

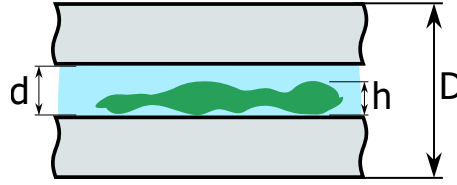


Figura 5.11.: Diagrama que ilustra un espécimen arbitrario (en verde) inmerso en su medio (en celeste) entre porta y cubre-objetos (en gris).

5.4.3. Obtención de mapas diferenciales de fase sintéticos en Microscopía Holográfica Digital, utilizando dos longitudes de onda

Consideremos un espécimen microscópico que se ubica entre un porta-objeto y un cubre-objeto, ilustrados en la Figura 5.11. Para cada longitud de onda λ_m ($m = 1, 2$), el retardo de fase que experimenta el haz objeto es :

$$\varphi_m = \frac{2\pi}{\lambda_m} (n_{\text{vidrio } m} D + (n_{0m} - n_{\text{vidrio } m})d + (n_m - n_{0m})h) \quad (5.21)$$

donde: D es la altura del contenedor del espécimen (especimen + medio + cubreobjeto + portaobjeto), h es el espesor del espécimen, d es el espesor total de la muestra (especimen + medio circundante), mientras que $n_{\text{vidrio } m}$, n_{0m} y n_m son los índices de refracción del vidrio (porta y cubre-objetos), del medio circundante y del espécimen para la longitud de onda λ_m respectivamente.

Los primeros dos términos dentro del corchete sólo contribuyen en un retardo de fase constante, mientras que el tercero cambia punto a punto debido a las diferencias de espesor en espécimen.

Si diferenciamos la Ecuación 5.21 se obtiene:

$$d\varphi_m = \frac{2\pi}{\lambda_m} (n_m - n_{0m}) dh$$

donde h es independiente de la longitud de onda con la que se construyó el holograma. Luego, para cada m , los diferenciales son distintos, pues difieren en la pendiente $C_m = \frac{2\pi}{\lambda_m} (n_m - n_{0m})$.

El cociente de los diferenciales para λ_1 y λ_2 resulta:

$$\frac{d\varphi_1}{d\varphi_2} = \frac{\lambda_2 (n_1 - n_{01})}{\lambda_1 (n_2 - n_{02})} \Rightarrow d\varphi_1 = C_{1,2} d\varphi_2 \quad (5.22)$$

donde $C_{1,2}$ es una constante de proporcionalidad entre estas magnitudes. Como consecuencia, las derivadas de ambos mapas de fase coinciden a menos de un factor real $C_{1,2}$. Dado que la Ecuación 5.22 relaciona las derivadas de ambas fases de manera lineal, $C_{1,2}$ puede estimarse mediante una regresión lineal.

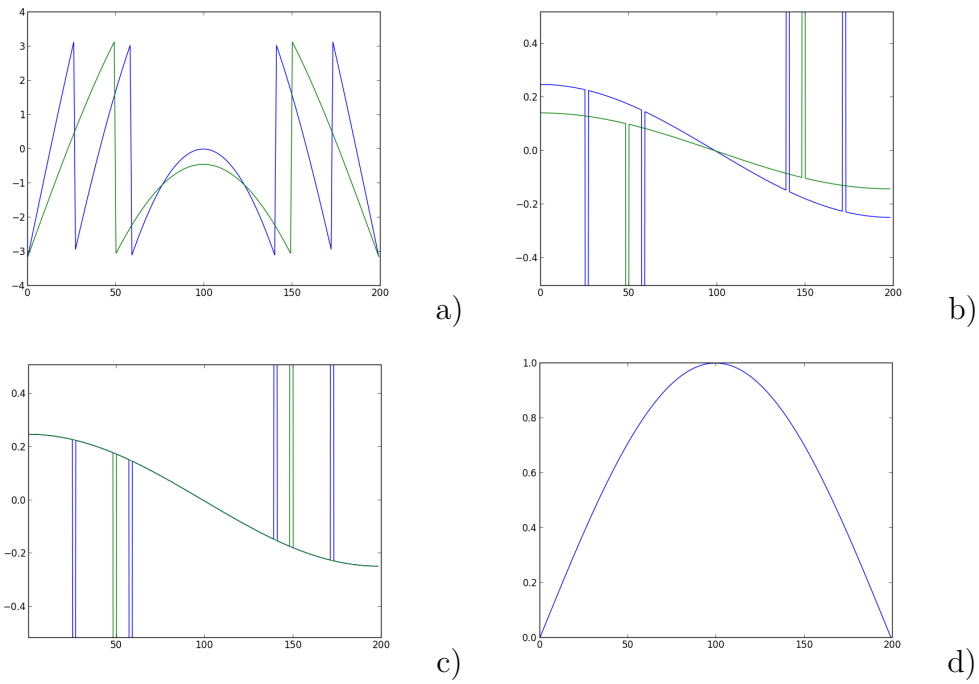


Figura 5.12.: Ejemplo de la aplicación del algoritmo, para dos longitudes de onda λ_1 (azul), y λ_2 (verde). a) Fases envueltas, b) Derivadas de a), c) Derivadas ajustadas según Ecuación 5.22 y d) Fase desenvuelta para λ_1 .

Para ilustrar la técnica que aquí se propone, se simulan dos mapas de fase envuelta unidimensionales ϕ_1 y ϕ_2 correspondientes a dos longitudes de onda arbitrarias λ_1 y λ_2 ; en la Figura 5.12a) se muestran los dos mapas de fase envuelta en azul y verde respectivamente. Dado que $\lambda_1 < \lambda_2$, ϕ_1 presenta más discontinuidades (mayor frecuencia espacial) que ϕ_2 . Asimismo, teniendo en cuenta que el índice de refracción es mayor a menores longitudes de onda, la pendiente de ϕ_1 en cada punto es mayor a la de ϕ_2 en el mismo punto. Esta noción queda claramente ilustrada en las curvas de la Figura 5.12b), que se corresponden con las derivadas de ϕ_1 y ϕ_2 , en azul y verde respectivamente, y en donde se advierte que $C_1 > C_2$. Ahora bien, según la Ecuación 5.22, es posible hacer coincidir las funciones derivadas, encontrando la constante $C_{1,2}$ que las relaciona. En términos prácticos, el cociente punto a punto de la Ecuación 5.22 arrojará un valor promedio con cierto grado de dispersión. Sin embargo, teniendo en cuenta la relación lineal que vincula ambas curvas, la utilización de un algoritmo de optimización que minimice el cuadrado de la distancia entre $d\phi_1$ y $C_{1,2}d\phi_2$ resultará en una constante $C_{1,2}$ más representativa.

Realizando este procedimiento, se logra que las derivadas sean iguales en todos sus puntos a excepción de aquellos lugares donde se presenta una discontinuidad en la fase, tal como se ilustra en la Figura 5.12c). Con esta información se construye, como se describe a continuación, lo que denominamos *Mapa diferencial sintético de fase* (MDSF). Este mapa se utiliza como un auxiliar para desenvolver uno de los dos mapas de fase. Convenientemente, se opta por elegir el obtenido para la menor longitud de onda ya que implica mayor resolución lateral.

La construcción del MDSF consiste en tomar los valores de la derivada de la fase envuelta para la menor longitud de onda (λ_1 en este caso) en todos los puntos excepto en aquellos donde se ubican los saltos. Éstos son reemplazados por los valores de la derivada del mapa de fase de mayor longitud de onda (mayor resolución transversal) multiplicado por la constante $C_{1,2}$ obtenida mediante regresión lineal. Como resultado, se disminuye el número de discontinuidades. Por último, el Mapa diferencial sintético así obtenido se desenvuelve por el método de los cuadrados mínimos, resultando el mapa de fase continua que se muestra en la Figura 5.12d).

La principal ventaja del método propuesto es que se combina la información más relevante de los mapas de fase, resolución lateral de uno y resolución transversal del otro.

A modo de ejemplo, en la Figura 5.13a) se muestra la imagen de amplitud que resulta al reconstruir el holograma de una microalga de la especie *Pediastrum*. Esta imagen es similar a la que se observa en un microscopio óptico convencional. Ahora bien, se toman dos hologramas del mismo espécimen con dos longitudes de onda distintas de un láser de Argón-Kriptón sintonizable. La Figura 5.13b) se muestra el mapa de fase módulo 2π correspondiente a una longitud de onda $\lambda_2 = 520$ nm. Por su parte, en la Figura 5.13c) se muestra el mapa de fase módulo 2π correspondiente a una longitud de onda $\lambda_1 = 514$ nm.

Los resultados del método se ilustran en la Figura 5.14. El primer mapa de fase

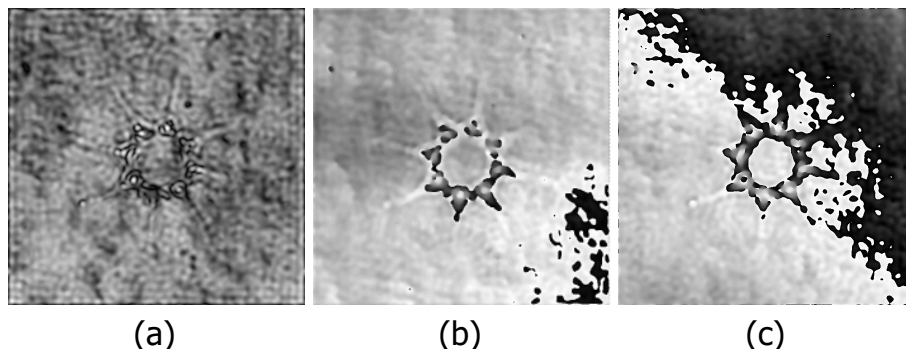


Figura 5.13.: a) módulo del holograma de una microalga de la especie *Pediastrum*; mapas de fase envuelta de hologramas de la microalga tomados con una longitud de onda de b) 520 nm y c) 514 nm.

continua se obtiene desarrollando por el método de cuadrados mínimos el holograma registrado con el láser sintonizado en $\lambda_1 = 514\text{nm}$. El segundo mapa se obtiene desarrollando el mismo holograma usando como guía el MDSF y luego aplicando cuadrados mínimos.

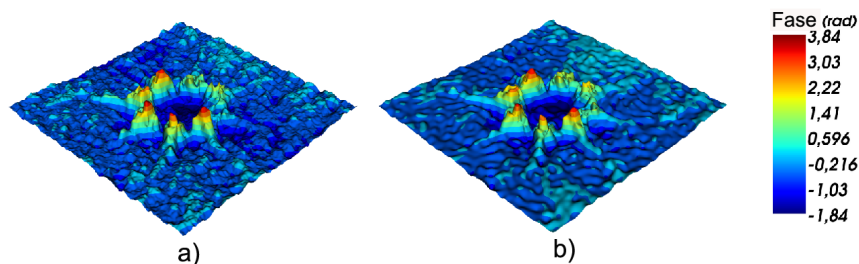


Figura 5.14.: Mapa continuo del mapa de la Figura 5.13c) obtenido: a) mediante el algoritmo de cuadrados mínimos, b) usando el MDSF

5.5. Conclusiones

Como se desprende de la Figura 5.14b, las mejoras obtenidas en el mapa de fase desenvuelta, mediante el método de dos longitudes de onda, no resultan significativas para el tipo de especímenes caracterizados en esta tesis. Además de requerir del registro de un holograma adicional, los costos en tiempos de procesamiento son mayores. Sin embargo, podría resultar en una herramienta alternativa en el caso de contar con hologramas con bajo ruido y objetos que introduzcan saltos de fase moderados, evitando, por ende, la necesidad de desenvolver.

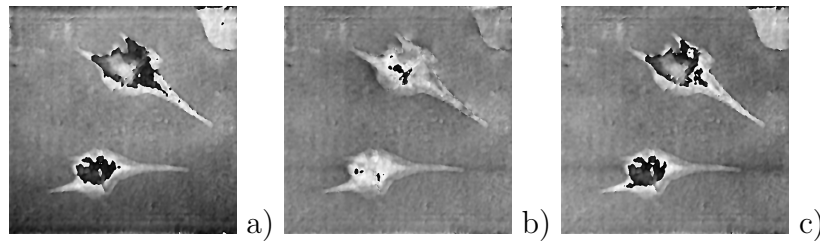


Figura 5.15.: a) Fase envuelta original; b) Fase envuelta del mapa de la Figura 5.4; c) Fase envuelta del mapa de la Figura 5.8.

Por otro lado, a los fines de la investigación en curso se encontró que el método de *Cuadrados Mínimos* es rápido, pero puede incurrir en soluciones incorrectas. En este sentido, el algoritmo de desenvolvemento por mapas de calidad (*Quality Guided*) es más confiable pero requiere tiempos de ejecución mucho más altos.

A diferencia de los algoritmos de desenvolvemento que siguen un camino particular, las soluciones que proveen los algoritmos por cuadrados mínimos no son congruentes con la fase envuelta; i.e, si se envuelve nuevamente la solución, no necesariamente la fase envuelta resultante es idéntica a la fase envuelta original. Esto se evidencia en la Figura 5.15, en los que se ha envuelto los mapas continuos obtenidos tanto por el método de cuadrados mínimos, como por el algoritmo por mapa de calidad. Ciertamente, el resultado que arroja cuadrados mínimos dista de la fase envuelta original, mientras que, por su parte, el algoritmo por mapas de calidad devuelve resultados más precisos.

Esto es así porque la formulación por cuadrados mínimos, minimiza los *cuadrados* de las *diferencias* entre los gradientes, por lo que los gradientes de la fase desenvuelta no coinciden estrictamente con los de la fase envuelta original, sólo lo hacen «lo mejor que pueden». En presencia de ruido, las soluciones provistas por cuadrados mínimos siempre subestiman las pendientes de la fase, para acomodar de un modo óptimo las inconsistencias de fase a nivel global. Las soluciones son «achataadas», tal como ocurre en un ajuste de curvas por cuadrados mínimos, en el que la curva de ajuste es siempre más suave que los datos medidos a partir de los cuales se calcula el ajuste. Esto trae aparejado un importante inconveniente: no contamos con la posibilidad de asegurar que el mapa de fase desenvuelto obtenido por cuadrados mínimos se corresponda con la fase física real que deseamos evaluar. El «achataamiento de fase» se evidencia en la Figura 5.15b), en el cual el mapa está apenas envuelto, presentando muy pocos saltos de fase mayores a 2π . En este sentido, el algoritmo estima que la microalga apenas retarda la fase de la luz que la atraviesa. La fase envuelta del holograma (Figura 5.15a)) da cuenta que esto no es así. Más aún, en términos cuantitativos, para el mismo holograma, cuadrados mínimos estima un retardo máximo de fase de aproximadamente 7 radianes, mientras que *quality guided* de 13 radianes (casi el doble). Teniendo en cuenta estas consideraciones, en los desarrollos siguientes se opta por emplear el método de desenvolvemento por mapas de calidad, a costa de implicar tiempos mayores de operación.

6. Procesamiento de los hologramas

El proceso de reconstrucción de un holograma obtenido mediante MHD, cualquiera sea el método elegido, requiere del ajuste y calibración de diversos parámetros. Algunos de ellos se discutieron previamente en el Capítulo 4, siguiendo principalmente las propuestas de Cuche *et al.* [CBD99, CMD99]. Parámetros tales como la distancia de reconstrucción, o los cosenos directores (discutidos en Subsección 4.2.3, Subsección 4.2.4 y Subsección 4.2.6) se ajustaron mediante mecanismos de prueba y error, puesto que no se tenía un conocimiento previo del valor exacto de los mismos. Como consecuencia, a partir de esta metodología el proceso de reconstrucción resultó especialmente lento.

Idealmente, para que un sistema de procesamiento a tiempo real sea robusto, dichos parámetros deben estimarse de manera automática o semiautomática. Es por ello que el presente capítulo está abocado a profundizar estos aspectos, así como a la propuesta de técnicas y procedimientos originales con el objetivo de automatizar algunos mecanismos del proceso de reconstrucción, y como resultado otorgarle versatilidad al sistema completo.

El capítulo se inicia con la implementación del método de reconstrucción PEA en lenguaje Python. Luego se exponen algunas técnicas de procesamiento de los hologramas. En este sentido, se presta especial atención al tratamiento del espectro, proponiendo procedimientos para automatizar y semi-automatizar el proceso de filtrado inherente al método PEA. Por otro lado, se ensaya un método de autofocus para automatizar el cálculo de la distancia de propagación. Por último, se exponen dos métodos de segmentación para extraer las regiones de interés (ROI) de los hologramas. En este aspecto, el objetivo es facilitar los ensayos ulteriores de cálculo de biovolumen y de identificación automática de especies.

6.1. Implementación del método PEA en lenguaje Python

Según lo expuesto en los capítulos previos, el método de reconstrucción PEA ofrece notables ventajas frente al resto, y es por ello que se lo adoptó como el método de reconstrucción para las investigaciones en el marco de esta Tesis. No obstante, el programa, tal como fue escrito en VISUAL BASIC[®], requiere que todas las operaciones involucradas en la reconstrucción deban realizarse en una secuencia concreta;

el programa no permite alterar el orden de ninguna de ellas, ni mostrar resultados de etapas las etapas anteriores conforme se avanza en la reconstrucción. Si bien el programa cumple con los requerimientos establecidos, exige conocimiento del orden exacto en el que deben ejecutarse los pasos del algoritmo, y esto debe cumplirse rigurosamente cada vez que uno desea alterar alguna de las variables involucradas en la reconstrucción. Otra desventaja notoria, y quizá la más importante, es que los parámetros de ajuste (cosenos directores, coordenadas de los filtros y distancia de reconstrucción) deben ser ingresados por teclado; cada vez que se desea modificar alguno de ellos, todos los pasos deben realizarse nuevamente. Adicionalmente, se precisa de gran cantidad de tiempo antes de poder ver los resultados de los parámetros escogidos pues el algoritmo no está optimizado. Estos problemas de desempeño son debidos principalmente a tener que usar el software en un ordenador obsoleto para mantener la compatibilidad con el *frame grabber* (diseñado para ser montado en placas madres de formato *AT*).

Teniendo en cuenta estas consideraciones y con el fin de lograr otorgarle mayor versatilidad al sistema, se evaluó la posibilidad de reescribir el algoritmo de reconstrucción PEA en un nuevo lenguaje que permitiera tener un acceso *espiralado* a todas las etapas involucradas en la reconstrucción. PYTHON es un Lenguaje de programación interpretado cuya filosofía hace hincapié en una sintaxis muy limpia y que favorece la escritura de código legible. Una desventaja importante es que no cuenta con una *interfaz integrada de desarrollo* (IDE), aunque cuenta con algunos sustitutos independientes como *Spider* y *Mayavi* que pueden resultar muy útiles para el desarrollo planeado. Cabe añadir como ventaja a favor de Python que está siendo adoptando como el nuevo lenguaje académico-científico por excelencia. Este fue el lenguaje que se eligió para reescribir el software de reconstrucción. Para ello, se recurrió al aporte de un experto en programación, quien adaptó el método PEA con estos requerimientos, y el resultado formó parte del seminario para adquirir el título de Técnico Superior en Análisis de Sistemas del Sr. Carlos Marcelo Cabrera, bajo la dirección de la autora de esta Tesis.

Una vista del resultado obtenido, tras la implementación de este nuevo lenguaje se muestra en la Figura 6.1, donde se observa claramente la amplia gama de posibilidades de interacción para evaluar los resultados y tomar decisiones pertinentes a la investigación. Tales decisiones, como tamaño de filtros, dureza de filtros, u otras que modifican notoriamente los resultados, nos permitieron ensayar con mayor celeridad con estas posibilidades para llegar a algunas de las conclusiones que se muestran en las secciones siguientes. En esta instancia, el programa no se encuentra actualizado, ya que algunos avances se ensayaron fuera de la interfaz gráfica.

Si bien con este programa se consiguió una ganancia en velocidad de procesamiento y en el diseño del sistema, el volumen de datos que en este tipo de procedimientos debe analizarse, y la gran cantidad de operaciones matemáticas que deben efectuarse, hacen que estos procesos aún sean lentos. En este sentido, sería deseable desarrollar un prototipo de software para la reconstrucción holográfica, que vincule simultáneamente la adquisición y procesamiento de las imágenes a tiempo real, en el menor

tiempo posible. Esto último requiere de computación de altas prestaciones, donde el uso del concepto de GPGPU (Programación de Propósito General sobre Unidades de Procesamiento Gráfico) resulta especialmente atractivo, ya que permite el desarrollo de aplicaciones masivamente paralelas a través de la arquitectura CUDA. La implementación de un software con este tipo de tecnología se vislumbra como una potencial e importante mejora en cuanto a los tiempos involucrados en los procesos de reconstrucción holográfica, con una ventajosa relación precio-rendimiento. En el mercado existen tarjetas gráficas de gama baja, media y alta, lo cual permite una inmediata adaptabilidad del proyecto según las necesidades de rendimiento. El proceso está en marcha en el marco de una tesis de Licenciatura en Análisis de Sistemas bajo la co-dirección de la autora. Se espera que los resultados a los que se arribe permitan contar con un sistema integrado versátil y rápido.

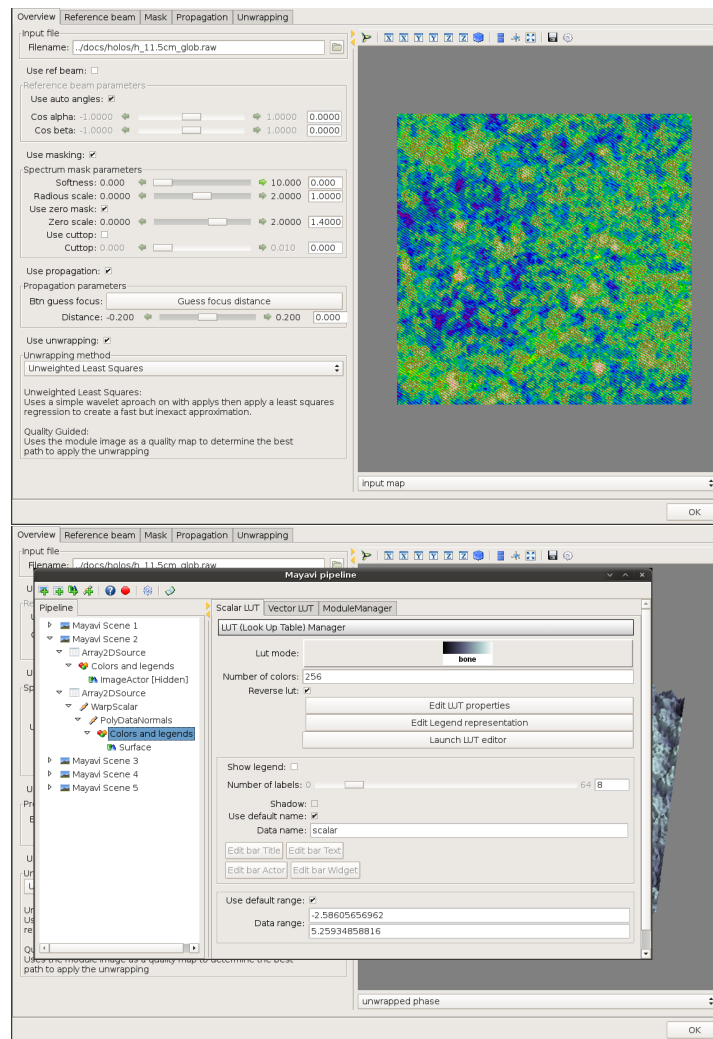


Figura 6.1.: Capturas de la interfaz gráfica de usuario en su estado actual. La imagen de arriba muestra la vista del panel de control general «Overview» y una representación gráfica del holograma abierto. La imagen de abajo muestra como se ha implementado el editor de tuberías (que ha sido relegado a otra ventana para no sobrecargar la interfaz principal).

6.2. Pre-procesamiento del holograma

Los procedimientos que se mencionan en esta sección no presentan un carácter fundamental en el proceso de reconstrucción holográfica; los mismos son opcionales y se aplicaron sólo en algunos casos que mostraron ser beneficiosos al contrastarlo con los hologramas reconstruidos sin procesamiento previo.

6.2.1. Normalización

Se normalizaron las imágenes obtenidas para garantizar el correcto funcionamiento de varios de los algoritmos de procesamiento de imágenes que se aplican en el tratamiento de la información. Este procedimiento es de carácter fundamental para intercambiar datos con librerías de terceros en los lenguajes de programación aquí utilizados. La normalización es un tratamiento lineal en el que se llevan todos los valores del mapa de bits al rango $[0, 255]$ y se los convierte a un tipo de datos de coma flotante con precisión arbitraria.

6.2.2. Apodización numérica

En los sistemas ópticos coherentes, como los tratados aquí, la difracción debida a bordes bien definidos y discontinuos induce la aparición de fluctuaciones del campo óptico transmitido. En nuestro caso, el holograma se recorta abruptamente al tamaño finito del sensor CCD o CMOS, por lo que naturalmente se convierte en una apertura difractante de bordes discontinuos. Estos últimos, pueden originar fluctuaciones del campo propagado, tanto en las distribuciones reconstruidas de amplitud como en las de fase; sus efectos son particularmente notorios en el espectro del holograma, que representa ópticamente la difracción de Fraunhofer o de campo lejano. Un método para mitigar estas ondulaciones consiste en apodizar el holograma; esto es, multiplicar el holograma por una apertura *suave*.

Una ventana, filtro o función de apodización, es una función matemática cuyo valor es cero fuera de un cierto intervalo. Cuando otra función se multiplica punto a punto por la máscara, el producto también es cero fuera del intervalo y todo lo que queda es la parte en la que la función y el filtro se superponen: «la vista a través de la ventana». Como ejemplo, una función que es constante dentro de cierto intervalo y cero en cualquier otro lado se denomina máscara *rectangular*. La máscara rectangular es una máscara dura, puesto que cambia abruptamente de un valor constante a cero. Este es precisamente el tipo de ventana que impone el CCD o CMOS al registrar el holograma. Como resultado, cada uno de los órdenes en el espectro se encuentra modulado por la función seno cardinal, tal como se observa en los patrones de difracción de Fraunhofer de una apertura rectangular y que se manifiesta como una cruz en cada orden del espectro ilustrado en la Figura 6.2a).

Si se desea aminorar los efectos difractivos de la apertura rectangular, la función de apodización debe cambiar paulatinamente de cero a uno; esto se logra multiplicando el holograma por una máscara denominada «*blanda*». Una alternativa consiste en insertar experimentalmente una apertura apodizada delante del sensor; sin embargo, resulta más práctico realizar la operación digitalmente mediante la construcción de una ventana numérica. Existen diversas funciones que cumplen este requerimiento; dentro del ámbito del procesamiento de señales suelen usarse las ventanas HAMMING, HANNING, BLACKMAN, entre otras [Har78]. A modo de ejemplo, en la Figura 6.2b)

se muestran los efectos de la apodización del holograma sobre el espectro cuando se utiliza un filtro KAISER. Se advierte que los efectos difractivos por los bordes discontinuos se ven disminuidos (atenuación de la función seno cardinal alrededor de cada orden). En la Subsección 6.3.3 se profundiza sobre las bondades del filtro KAISER. Brevemente, este consiste en una «familia» de filtros, cada uno de ellos fijado por un parámetro β que controla el grado de suavidad del filtro. En el caso de la Figura 6.2b) se utilizó un parámetro $\beta = 14$. Se debe ser muy cuidadoso al seleccionar la ventana de apodización; preferentemente éstas deben presentar una superficie transparente grande, y deben evitarse las ventanas con superficies transparentes estrechas, ya que la distribución de intensidad del holograma reconstruido también se apodiza con un perfil de transmisión similar. En los hologramas registrados en el contexto de esta tesis, raramente se han apodizado los hologramas; no obstante, se ha realizado un estudio más exhaustivo respecto de los beneficios de apodizar los filtros que se aplican en el espectro para seleccionar el orden de interés. Sobre este punto se profundizará más adelante dentro de este capítulo.

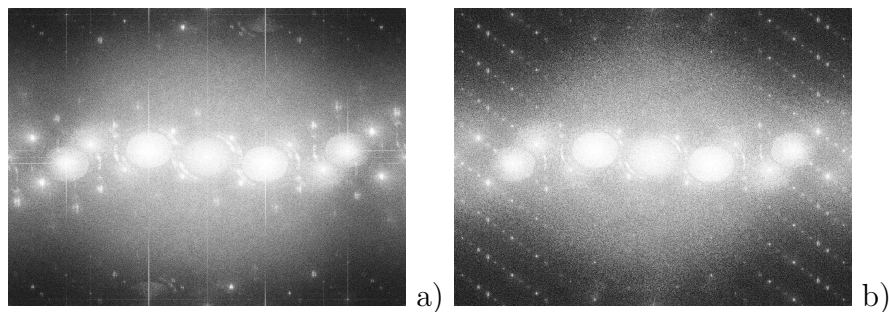


Figura 6.2.: Espectro de un holograma: a) sin apodizar, b) apodizado con una ventana Kaiser con un parámetro $\beta = 14$

6.2.3. Atenuación del orden cero

6.2.3.1. Introducción

En general, el orden cero (onda que atraviesa el holograma sin difractarse) es particularmente intenso. Como consecuencia, al reconstruir por el método de Fresnel, el campo reconstruido puede verse significativamente perturbado, mientras que, por su parte, al reconstruir mediante el Método de la Convolución o el método PEA el proceso de filtrado puede tornarse dificultoso. La perturbación es incluso más evidente cuando el ángulo entre el haz de referencia y el haz objeto es pequeño, puesto que en ese caso los tres órdenes (cero, real y virtual) se solapan parcialmente.

SCHNARS y JUEPTNER [SJ05] proponen la atenuación del orden cero restando al holograma, el promedio de la intensidad de todos los píxeles de la matriz del holo-

grama. Suponiendo una matriz cuadrada de $N \times N$, la intensidad promedio es:

$$I_m = \frac{1}{N^2} \sum_{j=0}^{N-1} \sum_{l=0}^{N-1} I(j\Delta x, l\Delta y)$$

Luego, en vez de reconstruir el holograma tal como fue capturado, se reconstruye:

$$I' = I - I_m$$

Si bien este mecanismo numérico ha sido incluido dentro de los programas de reconstrucción en el Capítulo 4, en esta sección se propone una alternativa para eliminar su contribución.

Recordemos que la información que se registra en el holograma, producto de la interferencia de la onda objeto y la onda referencia, se expresa matemáticamente con la expresión dada por la Ecuación 3.1:

$$I(x, y) = |O|^2 + |R|^2 + 2OR \cos [\phi_R(x, y) - \phi_O(x, y)]$$

donde los dos primeros términos (la intensidad del objeto $|O|^2$ y la intensidad del haz de referencia $|R|^2$) representan contribuciones no interferométricas (o incoherentes) y constituyen el denominado *orden cero*. Según esta ecuación para eliminar su contribución, bastará con restar punto a punto al holograma las imágenes del haz de referencia y el haz objeto. Este método será útil siempre que el objeto de estudio se encuentre estacionario. No obstante, aún en esa situación ideal, pueden ocurrir fluctuaciones en la iluminación durante el registro que deben corregirse numéricamente. Es por ello que a continuación, se expone un algoritmo alternativo simple, de costo computacional bajo para eliminar el orden cero. En el mismo se considera la información física presente en el orden cero y se la combina con un procesamiento numérico ulterior.

6.2.3.2. Resta adaptada

Al holograma se le restan incoherentemente los campos uniformes correspondientes a la intensidad de los haces objeto y referencia respectivamente, tapando alternativamente el haz de referencia y el haz objeto, según el procedimiento que se detalla a continuación.

$$I'_H(j, l) = I_H(j, l) - K_1 O(j, l) \tag{6.1}$$

$$I''_H(j, l) = I'_H(j, l) - K_2 R(j, l) \tag{6.2}$$

donde K_1 y K_2 son números reales cuyos valores se obtienen haciendo que la varianza de las diferencias en las Ecuación 6.1 y Ecuación 6.2 sea mínima. Luego, se

reconstruye I_H'' . Esta metodología produce una notable atenuación del orden cero del holograma. En particular, para el método PEA facilita el proceso de filtrado en el espectro del orden de difracción de interés (imagen real o imagen virtual), previo a la propagación del espectro inherente al método.

K_1 y K_2 se encuentran mediante el algoritmo de minimización no lineal NELDER-MEAD [NM65].

La resta definida en la Ecuación 6.1, en conjunto con el procedimiento de minimización puede generalizarse para cualquier par de matrices, y es usada en otros procedimientos en el contexto de esta tesis y se la bautiza con el nombre de *Resta adaptada*.

6.2.3.3. Resultados

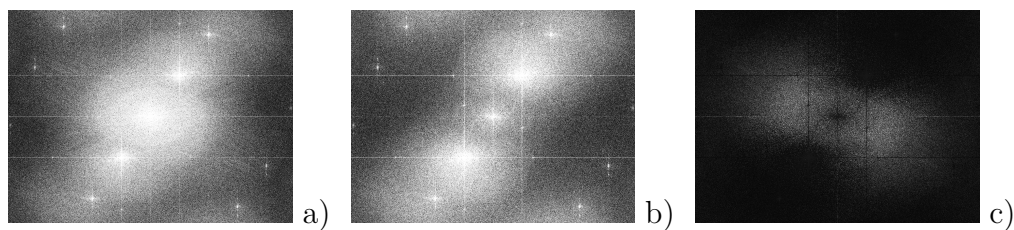


Figura 6.3.: a) espectro obtenido de la resta directa entre holograma, haz objeto y haz de referencia; b) espectro obtenido tras aplicar el algoritmo descrito; c) diferencia entre ambos espectros.

En la Figura 6.3 se ilustran los resultados que arroja el algoritmo visibles en el espectro de un holograma, que en este caso, no se ha apodizado. Con fines comparativos, en la Figura 6.3a) se observa el resultado de aplicar la resta incoherente de holograma, haz objeto y haz de referencia. Por su parte, en la Figura 6.3b) se aprecia una clara mejoría cuando se aplica el algoritmo propuesto mediante la aplicación sucesiva de dos restas adaptadas; el orden cero se ve notablemente atenuado. Por último, en la Figura 6.3c) se exhibe la diferencia entre ambos espectros en la cual se observa que la información de interés (orden real o virtual) no ha sido perturbada, lográndose la eliminación de orden cero y ruido de alta frecuencia.

Adicionalmente, en la Figura 6.4 se muestran los hologramas reconstruidos para ambos casos. Cuando no se aplica el método, se advierten artefactos y discontinuidades espurias en el mapa de fase desenvuelto, mientras que se exhibe una mejoría notoria cuando el pre-procesamiento es aplicado.

6.3. Tratamiento del espectro

Las imágenes holográficas obtenidas mediante MHD se reconstruyen mediante computadora haciendo uso de los resultados que se desprenden de la teoría escalar de la

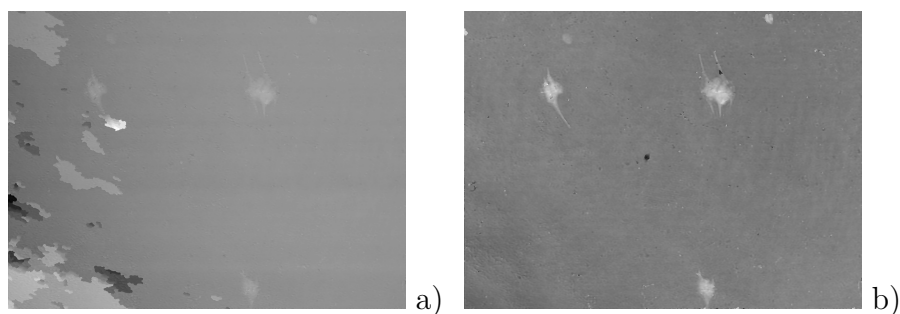


Figura 6.4.: a) fase del holograma reconstruido con la resta directa de los haces objeto y referencia; b) fase del mismo holograma cuando se aplica el algoritmo propuesto.

difracción. Del análisis realizado en la Subsección 4.2.7, surge que el método de PEA tiene la ventaja de permitir el filtrado sencillo, eliminando todas las frecuencias espaciales excepto las portadoras de la información concreta de la objeto (léase, orden real o virtual). En general, se desea preservar un orden de difracción y eliminar la perturbación del orden cero, de la imagen gemela, y algunas interferencias parásitas que surgen del registro del holograma y que se evidencian en el espectro (Transformada de Fourier Directa) del mismo.

El proceso de filtrado involucra una operación digital, y se lleva a cabo multiplicando el espectro del holograma con una máscara numérica. Las máscaras se aplican previos a la propagación del espectro y generalmente consisten en filtros duros, simétricos, cuadrados o circulares, que abarcan toda la información correspondiente al orden de interés. En la mayor parte de los casos, el diseño de la máscara es manual, y se lleva a cabo mediante la inspección visual sobre la amplitud del espectro del holograma [CMD00]. Esta también fue la manera con la que se operó en las instancias preliminares de estas investigaciones, expuestas en la Sección 4.2, donde se aplicaron filtros cuadrados o rectangulares contruidos a mano y «centrados» en algún orden particular del espectro.

Como alternativa, y con el objeto de otorgarle mayor versatilidad al proceso, en esta sección se propone una metodología de filtrado semiautomática. Adicionalmente, se ensaya la aplicación de filtros circulares con distintos grados de dureza, desde filtros duros a filtros blandos, tanto simétricos, como no simétricos. Para ello, en una primera instancia se propone un método simple para la ubicación automática de las frecuencias portadoras de los tres órdenes de difracción, alrededor de alguno de los cuales puede centrarse la máscara. Luego, se establece un criterio para la elección, por defecto, del tamaño de la máscara que se construye alrededor del orden de interés (virtual o real). Por último, se propone la utilización del filtro KAISER por sus bondades y versatilidad para apodizar el orden de interés variando el grado de dureza conforme se modifica un parámetro.

6.3.1. Identificación automática de los órdenes

Para alcanzar la construcción semiautomática de filtros, el primer paso consiste en identificar las coordenadas de los órdenes de difracción de manera automática. De este modo, se prescinde de la inspección visual que sólo permite una estimación aproximada. A modo de ejemplo, en la Figura 6.5 se ilustra en una imagen pseudo-coloreada el módulo de un espectro típico de un holograma; en él se visualizan los tres órdenes bien característicos que surgen en holografía y se destaca que cada orden presenta un gran pico de intensidad en su centro. Para identificar el orden, es necesario entonces identificar las coordenadas de estos picos (máximos), para lo cual el módulo del espectro del holograma constituye un excelente mapa *guía*.

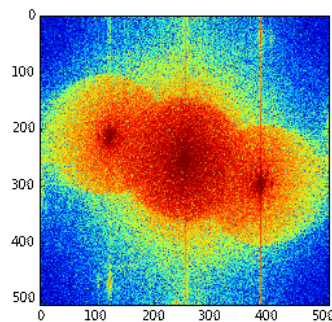


Figura 6.5.: Ejemplo del espectro de un holograma.

Supongamos que deseamos obtener las coordenadas (x_v, y_v) de la frecuencia portadora del orden virtual. Sea la coordenada x en la dirección de las columnas, e y en la dirección de las filas. Luego, a partir del módulo del espectro se crea una curva unidimensional sumando para cada columna (fila), los valores de intensidad para todas las filas (columnas). Para ilustrar el resultado, en la Figura 6.6, se muestra en azul la curva que se obtiene con este procedimiento para el caso particular en que se suman todas las filas para cada columna del espectro de la Figura 6.5. Tal como en este caso, en general en este tipo de perfiles se observan la ubicación de los picos para el orden cero, imagen real e imagen virtual en la dirección de las columnas (filas).

La identificación automática de la posición de estos máximos podría llevarse a cabo mediante algoritmos iterativos tradicionales; no obstante, estos son susceptibles de estancarse en máximos locales, y por ende no son adecuados para el fin que se persigue. Por este motivo, se diseña un algoritmo sencillo para identificar automáticamente estas coordenadas. El mismo consiste en pasar una pequeña ventana (usualmente de unos 25 pix) por la curva azul de la Figura 6.6: si el centro de la misma coincide con el valor máximo de la curva en esa ventana, el centro es el máximo buscado; sino, todos los valores de la curva que caen dentro de la ventana son llevados al mínimo absoluto de la curva. Operando de esta manera, se obtiene la curva en verde en la Figura 6.6, en la cual los máximos locales son los únicos puntos

que toman valores distintos de cero.

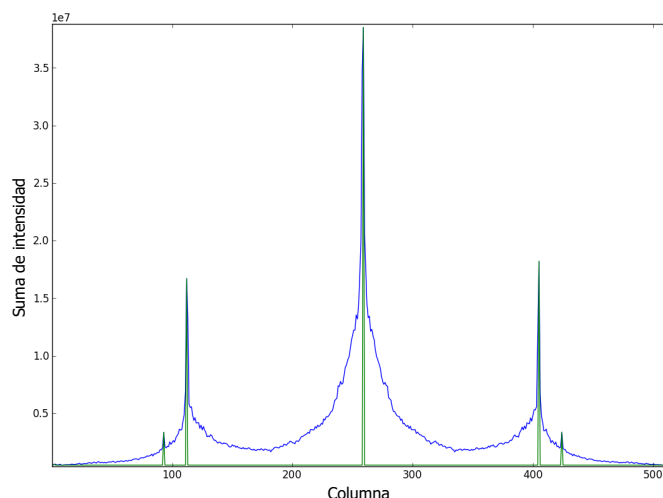


Figura 6.6.: Curva azul: Valores acumulados de intensidad en la dirección de las columnas; curva verde: Respuesta del filtro que identifica los picos del espectro en la dirección de la columna.

Luego, estos puntos se arreglan en un vector de mayor a menor según la intensidad del pico (o al revés, es indistinto). El orden cero representa el pico más grande; por su parte, la imagen virtual y real corresponden al segundo o tercer máximo. Luego, se selecciona automáticamente el segundo máximo de la lista que, supongamos sin pérdida de generalidad, se corresponde con la imagen virtual. De esta manera, se obtiene la coordenada x_v del máximo seleccionado en la dirección de las columnas (filas). Luego, para encontrar la ubicación exacta de la coordenada y_v de la imagen virtual, se realiza una búsqueda exhaustiva en la imagen del espectro (Figura 6.5) pero sólo dentro de un entorno «reducido» de las columnas; esto es, en la región $x_v \pm \epsilon$ (con ϵ un entero mucho menor que el número total de columnas) se suma para cada fila, todas las columnas pertenecientes al entorno reducido. Con esto, se obtiene una curva similar a la de la Figura 6.6 de la cual se extrae la coordenada y_v . Se obtienen así las coordenadas del máximo de interés (x_v, y_v) . Esta combinación de un método aproximado y un método exhaustivo permite obtener resultados confiables con un costo relativamente bajo.

6.3.2. Criterio de selección para el tamaño de la máscara

El mismo procedimiento (Subsección 6.3.1) se aplica para encontrar la ubicación del centro del orden cero (x_0, y_0) . A continuación, se determina el segmento vector que une las coordenadas del centro del orden cero con las coordenadas del centro del orden virtual (real) $r_{v0} = (x_v - x_0)\hat{i} + (y_v - y_0)\hat{j}$. Se gira la imagen del espectro

hasta que el vector r_{v0} yace en posición horizontal. Luego, se extrae una sub-imagen seleccionando un entorno en la dirección perpendicular a la del segmento vector. El resultado se exhibe en la imagen pseudo-coloreada de la Figura 6.7.

Se observa que la intensidad decrece conforme nos alejamos del orden cero en la dirección de las columnas, hasta que alcanza un mínimo y luego comienza a crecer nuevamente conforme se acerca al la frecuencia portadora de la imagen virtual. Por ello, para cada columna de esta imagen, se suman todas las filas y se obtiene un perfil de intensidades que contiene un valle entre las coordenadas del orden cero y la imagen virtual. Finalmente, la distancia entre el orden de interés y el valle se toma como un factor de escala r para calcular el radio de la máscara. El radio de la máscara circular se establece como $R = ar$, donde a es un factor multiplicativo que puede ingresarse externamente. Si $a < 1$, la máscara es pequeña y excluye parte de la información del orden de interés. mientras si $a > 1$ la máscara abarca con una probabilidad alta toda la información del orden de interés. Por defecto, $a = 1,5$.

6.3.3. Creación de máscaras

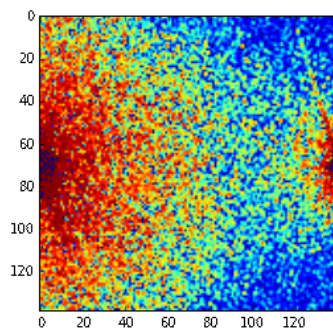


Figura 6.7.: Recorte alrededor del segmento vector r_{v0}

Siguiendo el procedimiento descrito en la sección anterior, se crean máscaras circulares de radio R , que dejan pasar sólo la información del orden virtual (real). Ahora bien, con el objetivo de estudiar cómo se ve afectada la calidad de los hologramas reconstruidos tras aplicar distintos tipos de filtros, es que se propone apodizar los órdenes a filtrar. Para ello se implementan filtros circulares de distintos tamaños y con distinto grado de dureza. Los filtros blandos (o suaves) generalmente representan funciones que crecen y decrecen suavemente,

y que, por lo tanto, aminoran los efectos inducidos por las discontinuidades que surgen tras la aplicación de las sucesivas Transformadas de Fourier involucradas en el proceso de reconstrucción. En la literatura [Har78], se describen distintos tipos de filtros de gran utilidad en el procesamiento de señales.

Particularmente, en holografía la elección de la forma y tamaño de filtro depende de cada caso particular y de la información que se desea evaluar y/o conservar. Así, cobra importancia el nivel de ruido en el holograma, y la relevancia de la información relacionada con textura, bordes, etc. del objeto al que se le realiza el holograma. Por lo tanto existe un compromiso entre la información que se desea quitar y la que se desea conservar, dependiendo del caso de estudio.

La ventana KAISER-BESSEL es particularmente adecuada para nuestros propósitos,

β	similitud con
0	Rectangular
5	Hamming
6	Hanning
8.6	Blackman

Cuadro 6.1.: Valores del parámetro β que aproxima ventanas conocidas

ya que puede aproximarse a otras ventanas bien conocidas tales como HAMMING, HANNING, *Rectangular* y BLACKMAN, variando solamente un parámetro que controla el grado de suavidad de la ventana, y, por lo tanto, la forma de la ventana. Matemáticamente, la ventana de KAISER unidimensional se define como sigue:

$$w(n) = \begin{cases} \frac{I_0\left(\beta\sqrt{1-\left(\frac{n}{M/2}\right)^2}\right)}{I_0(\beta)} & \text{si } -\frac{M-1}{2} \leq n \leq \frac{M-1}{2} \\ 0; & \text{en c.o.c.} \end{cases}$$

con M el tamaño de la ventana, I_0 el orden cero de una función de Bessel modificada de primera especie dada por:

$$I_0(X) = \sum_{k=0}^{\infty} \left[\frac{\left(\frac{X}{2}\right)^k}{k!} \right]^2$$

y β un número real positivo arbitrario que controla el grado de dureza. Los valores de β típicos para emular las ventanas más conocidas se muestran en la Tabla 6.1. Del mismo modo, en la Figura 6.8 se muestran las ventanas obtenidas para distintos valores del parámetro β ; adicionalmente, con fines comparativos se muestra la similitud con las ventanas más conocidas.

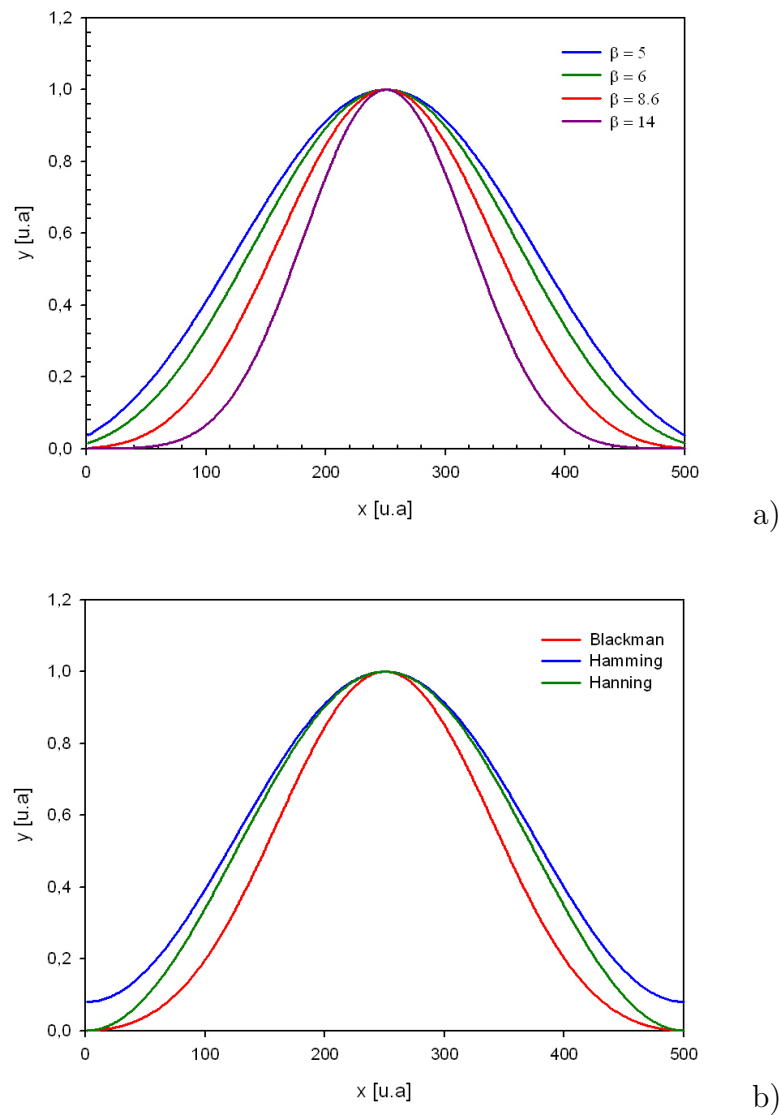


Figura 6.8.: a) Ejemplos de ventanas Kaiser para distintos valores de β ; b) Ventanas típicas

6.3.3.1. Apodización de las máscaras

Ejemplos típicos de las ventanas KAISER aplicadas al orden de la imagen virtual se ilustran en la Figura 6.9, así como su efecto sobre los mapas de fase de un holograma de glóbulos rojos. Claramente, mientras más suave es la ventana (mayor valor del parámetro β), menos perceptibles se tornan las ondulaciones inducidas por las discontinuidades. No obstante, la elección de la ventana más adecuada dependerá del caso de interés. Por ejemplo, si se quisiera determinar el biovolumen de una especie microalgal, el filtro preferentemente deberá ser ya sea duro o con un nivel

de suavidad equivalente a una ventana Hamming o Hanning, ya que se desea sumar cualquier contribución del espécimen al volumen total. Por lo contrario, cuando se desea realizar segmentación de imágenes, un filtro blando facilitará el correcto desempeño del algoritmo.

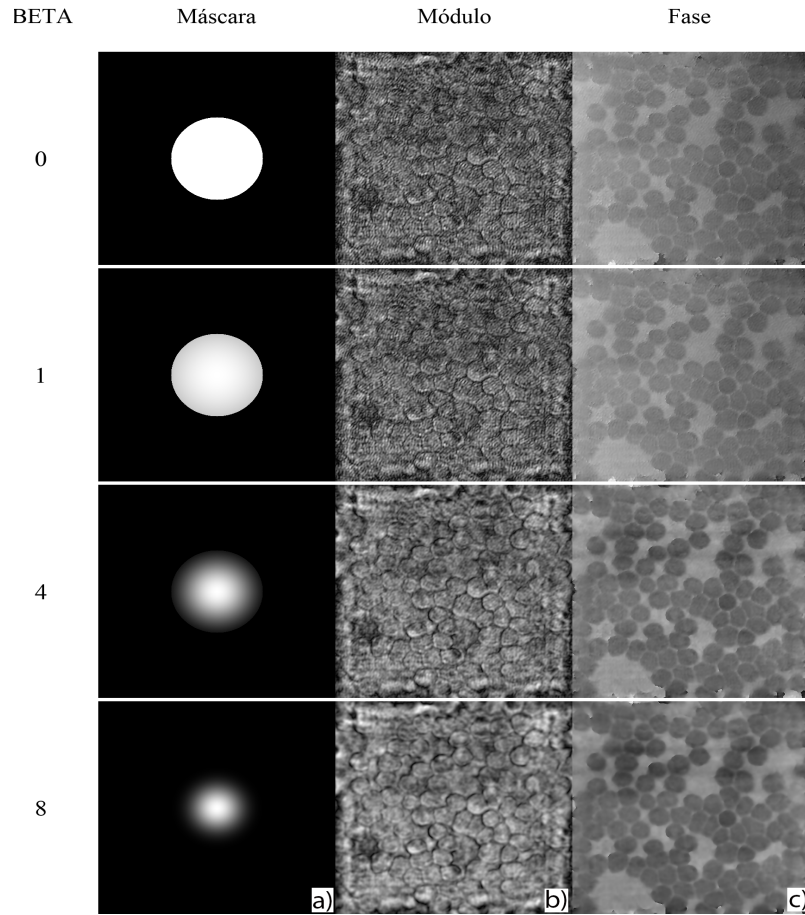


Figura 6.9.: a) Ejemplo de máscaras Kaiser aplicadas en el orden virtual del espectro de holograma con distintos valores del parámetro BETA; imágenes reconstruidas de b) amplitud y c) fase.

6.3.3.2. Máscaras asimétricas

Como se discutió previamente, cuando se observan los espectros típicos de los hologramas obtenidos por MHD (Figura 6.5) se advierte que en muchos casos los tres órdenes o lóbulos característicos del espectro de un holograma se encuentran parcialmente superpuestos. Esto significa que no es posible aislar completamente la información de alguno de ellos. Basados en esta problemática, es que se propone la aplicación de filtros no simétricos (Figura 6.10), que eliminan la contribución del orden central. Para ello, se resta de la máscara obtenida para el orden virtual (construida según lo propuesto en las secciones previas Subsección 6.3.1, Subsección 6.3.3 y Subsección 6.3.2) una máscara que abarque en su totalidad al orden cero. El criterio y mecanismo para construir esta última máscara es idéntico al empleado para construir la máscara alrededor del orden virtual (real):

- Se identifican las coordenadas del centro del orden cero (x_0, y_0)

- El radio de la máscara que abarca al orden cero es $R_0 = br_0$, donde r_0 es la distancia desde (x_0, y_0) al valle de la curva obtenida de acuerdo al procedimiento descrito en la Subsección 6.3.2 y b es un número real generalmente mayor a 1.

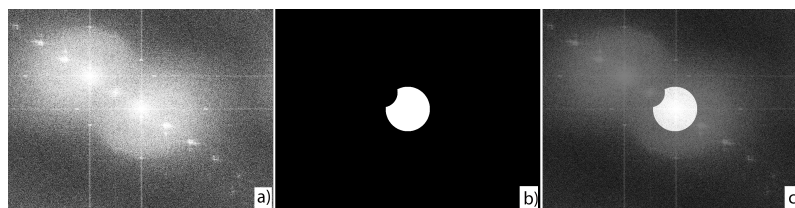


Figura 6.10.: a) espectro; b) ejemplo de filtro asimétrico; c) suma ponderada de a) y b). En este caso no se ha apodizado el holograma, ni las máscaras.

La metodología propuesta se presenta como una alternativa para eliminar la contribución del orden cero si no se desea, o bien no fuera posible, aplicar el procedimiento descrito en la Subsección 6.2.3. Comparativamente, la decisión de aplicar una máscara asimétrica repercute en una ganancia en la velocidad con la que se toman los hologramas, pues en este caso no se requiere tomar una imagen del haz objeto y otra del haz de referencia. El método puede ser particularmente útil cuando se desea realizar hologramas de microorganismos móviles, en cuyo caso la técnica de la Subsección 6.2.3 fallará. Cabe mencionar, además, que la calidad de los hologramas reconstruidos se ve mejorada cuando se utilizan filtros asimétricos. A modo de ejemplo, en la Figura 6.11 se ilustra este efecto en la reconstrucción de un holograma. Se advierte que cuando se aplica un filtro simétrico, la fase presenta algunos artefactos, que desaparecen cuando se aplica el filtro no simétrico de la Figura 6.10b).

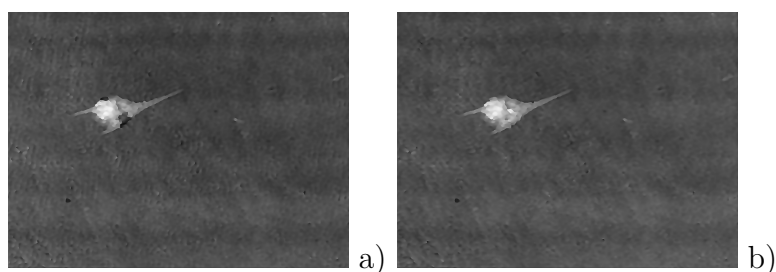


Figura 6.11.: Fase de un holograma a) Filtro simétrico; b) Filtro no simétrico.

6.4. Implementación de un mecanismo de autofocus

En muchas aplicaciones a nivel microscópico, tales como ensayos no destructivos y adquisición de imágenes de células vivas, se requieren de mecanismos de autofocus, ya sea por condiciones experimentales inestables o por limitaciones debidas a escasas profundidades de campo dadas por los sistemas ópticos utilizados. Como hemos

recalcado previamente, una de las ventajas de la MHD es la posibilidad de reconstruir a distintas distancias a partir de un único holograma, sin la necesidad de contar con mecanismos de realineación, con lo cual el enfoque mecánico de los métodos de microscopía tradicionales se sustituyen por su contraparte digital.

Debido a los requerimientos para reconstrucción de hologramas digitales (Ver Capítulo 3 y Capítulo 4), y para evitar efectos de aliasing, en MHD los hologramas son capturados fuera de foco (Método Fresnel y Convolución). Esto supone que, para lograr reconstruir el holograma enfocado, deba conocerse con antelación la distancia a la cual se enfoca la imagen a registrar. La tarea no es sencilla pues exige que ésta se determine experimentalmente. Con estos fines es aconsejable construir una curva de calibración con la que se pueda conocer la distancia de reconstrucción correspondiente a cada desplazamiento del tornillo micrométrico adosado a la platina del microscopio (procedimiento explicado en Subsección 4.2.3). Esta tarea insume mucho tiempo y debe realizarse cada vez que el montaje es modificado, ya sea cambiando el OM o modificando la posición de la cámara. Teniendo en cuenta estas consideraciones, un método para la determinación automática de la distancia de enfoque resulta de gran utilidad y en esta sección nos abocamos a describir el método elegido para alcanzar este objetivo.

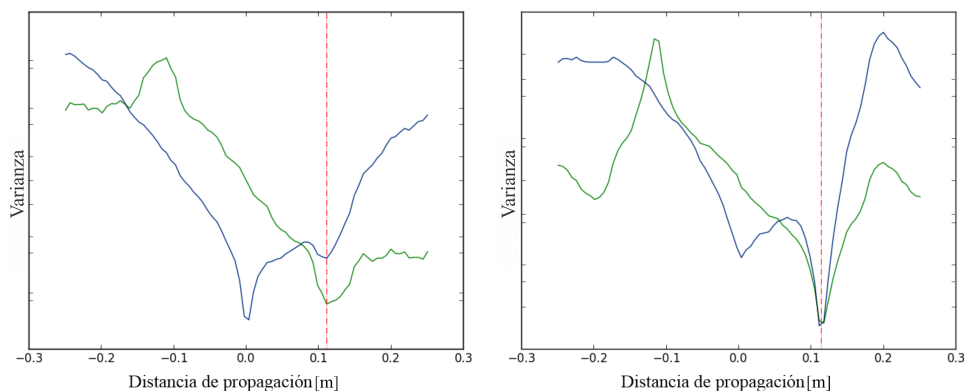


Figura 6.12.: $\text{var}[d]$ (en azul) y $f_{\text{autofoco}}[d] = \text{var}[d] - \text{var}[-d]$ (en verde) para dos hologramas diferentes. En ambos casos se elimina exitosamente el mínimo en $d \approx 0$, permaneciendo sólo los mínimos cercanos a las distancias correctas de enfoque (indicadas con rojo).

Uno de los métodos usados en fotografía convencional consiste en encontrar el mínimo de la varianza del fotograma como función de d , la distancia de enfoque. Si el fotograma está enfocado en $d = d_{\text{enf}}$, en ese punto la curva $\text{var}(d)$ presenta un mínimo.

A modo de ejemplo, la curva azul de la Figura 6.12 representa cómo cambia la varianza del módulo de un holograma, conforme se reconstruye a distintas distancias. La línea punteada roja denota la distancia de enfoque determinada experimentalmente. Claramente, se observa que la curva presenta un mínimo en ese punto; sin

embargo, no es el único y, por lo tanto, esta curva no puede utilizarse de manera directa para encontrar la distancia de enfoque automáticamente. En holografía los efectos de difracción hacen que la varianza del módulo fluctúe de una manera mucho menos uniforme que en fotografía convencional. En general, todas las curvas de varianza que se obtuvieron para distintos hologramas presentaron gran cantidad de mínimos locales poco perceptibles, un mínimo marcado en la distancia correcta de enfoque y un mínimo pronunciado en cero. Si quisiéramos aplicar algún algoritmo de localización de mínimos, éste podría converger en cualquiera de estos mínimos locales y quedar estancado allí. Esto no garantiza la estimación correcta de la distancia de enfoque.

La mayoría de los mínimos espurios puede eliminarse fácilmente aplicando algún filtro suave, como por ejemplo un filtro gaussiano o una media móvil. Sin embargo, el mínimo en cero es el que reviste mayor importancia de ser eliminado, por lo que a continuación se propone una solución simple para facilitar la identificación del mínimo relacionado con la distancia de enfoque.

Las características de las curvas obtenidas mediante el cálculo de la varianza presentaron cierta regularidad, que hicieron plausible la idea de buscar el mínimo en una nueva función basada en la función $var(d)$ y que elimina el mínimo en cero para todos los casos. La distancia de enfoque para el holograma, $d = d_{enf}$, puede determinarse automáticamente buscando el mínimo absoluto de la siguiente función:

$$f_{\text{autofoco}}[d] = \text{var}[d] - \text{var}[-d]$$

con d la distancia de propagación. La curva verde de la Figura 6.12 es la representación gráfica de esta función, en la que se observa un mínimo pronunciado sólo en la distancia de reconstrucción correcta. Luego, implementando el *algoritmo de Nelder-Mead* [NM65], es posible encontrar el mínimo de manera iterativa.

6.5. Segmentación de imágenes

La morfología de especímenes biológicos, en lo que se refiere a su morfología tridimensional o forma bidimensional, es una característica que ha mostrado ser útil en diversas aplicaciones. Por citar algunos ejemplos, la medicina precisa de estimaciones morfológicas para la caracterización de células de tejidos en biopsias, o bien la morfología del espermatozoide es un indicador útil en la predicción de la capacidad de fertilización, entre otras [MDCD⁺11, MMM⁺13]. Al mismo tiempo el biovolumen y la biomasa, enfoque de esta tesis, constituyen parámetros de gran relevancia en diversas áreas de investigación desde taxonomía hasta el estudio de la salud del ecosistema [HRK⁺99, SL03, VCB07, VMF13]. Usualmente, este tipo de análisis se lleva a cabo mediante inspección visual, por lo que todo el proceso se caracteriza por un alto grado de subjetividad y sesgo. La necesidad de estimaciones y evaluaciones más precisas y objetivas de estos parámetros requiere del desarrollo de sistemas asistidos por computadora.

El primer paso para llevar a cabo análisis morfométricos 3D y 2D consiste en detectar y extraer de forma precisa la *región-de-interés* (ROI, region-of-interest), para lo que se precisa el desarrollo de algoritmos específicos. En el contexto del procesamiento digital de imágenes, este proceso se encuentra dentro del campo de la visión artificial denominado *segmentación*, que consiste en subdividir una imagen en sus regiones constituyentes u objetos. El nivel al cual se lleva la subdivisión, depende del problema que se quiere resolver. Esto es, la segmentación podría detenerse, por ejemplo, cuando los objetos de interés hayan sido aislados. Este último es nuestro caso de estudio, pues el objetivo es separar exitosa y automáticamente lo que representa el fondo de nuestras imágenes de los microorganismos o microalgas.

Esta tarea constituye una de las más arduas en el campo del procesamiento digital de imágenes, ya que la precisión con la que se lleva a cabo determina el eventual éxito o fracaso de los procedimientos de análisis computacionales involucrados. Los algoritmos de segmentación para imágenes monocromas se basan, por lo general, en dos propiedades básicas de los valores de intensidad de la imagen, la discontinuidad y la similitud. En el primer caso, el enfoque busca segmentar la imagen basándose en cambios abruptos en la intensidad, como representan los bordes en una imagen. En el segundo caso, se divide la imagen en regiones que son similares de acuerdo a un criterio pre-definido.

El aporte original en nuestros casos de estudio consiste en sacarle provecho a la información que obtenemos por MHD. Recordemos que con esta técnica contamos con una metaimagen *per se*, i.e., una imagen de amplitud, y una imagen de fase, para un sólo holograma reconstruido. Esta ventaja nos posibilita explotar la gran cantidad de información contenida en las imágenes de fase. La información contenida en el módulo es similar a la que se obtiene por microscopio óptico. Por ello, en esta sección se contrastan los resultados que se alcanzan tanto para las imágenes de módulo como para las imágenes de fase.

6.5.1. Segmentación por similitud o umbralización

Debido a sus propiedades intuitivas, la umbralización de imágenes tiene una posición preponderante en las aplicaciones de segmentación de imágenes. La imagen que se muestra en la Figura 6.13a) corresponde a una imagen, $f(x, y)$, compuesta de un objeto claro (fase de microalga) inmersa en un fondo comparativamente más oscuro. El histograma correspondiente (Figura 6.13b)), muestra que los píxeles del objeto y del fondo tienen niveles de intensidad agrupados en dos modos dominantes. Claramente, una manera de extraer los objetos del fondo es seleccionar un umbral T que separe estos modos. Cualquier punto (x, y) para el cual $f(x, y) \geq T$ es un punto del objeto, mientras que en cualquier otro caso será un punto del fondo.

Formalmente, una imagen umbralizada $g(x, y)$ se define como:

$$g(x, y) = \begin{cases} 1 & \text{si } f(x, y) \geq T \\ 0 & \text{si } f(x, y) < T \end{cases}$$

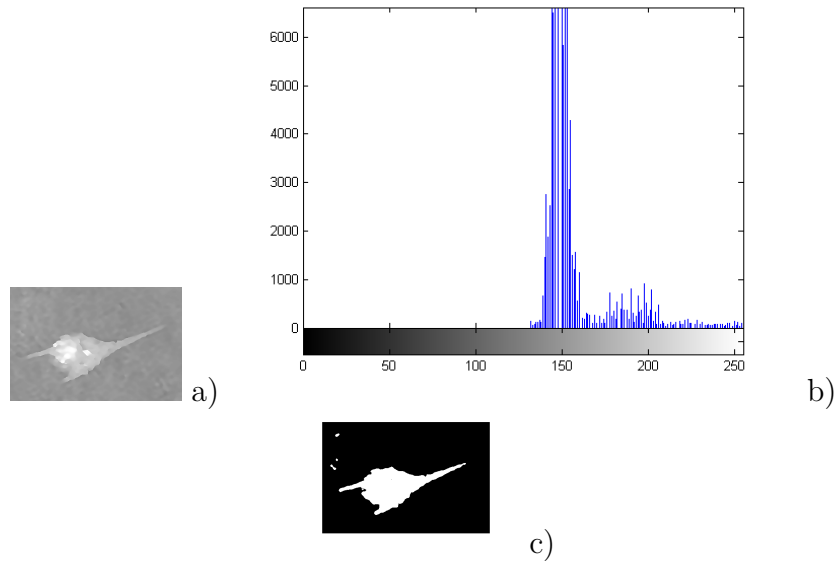


Figura 6.13.: a) imagen ejemplo; b) histograma; c) imagen umbralizada con $T = 165$.

Los píxeles etiquetados con 1 corresponden a objetos, mientras que los etiquetados con 0 corresponden al fondo. Cuando T es constante, este enfoque se denomina *Umbralización Global*.

Una forma de elegir un umbral es por inspección visual del histograma de la imagen, otro método es por prueba-error, eligiendo distintos umbrales hasta encontrar uno que produzca un resultado adecuado a juicio del observador. Sin embargo, en nuestros experimentos emplearemos un método para la elección automática del umbral más adecuado. De esta manera, el método podrá ser robusto a diferentes tipos de imágenes pobladas de distintas clases de objetos.

6.5.1.1. Umbralización por algoritmo de Otsu

El algoritmo de OTSU (1979)[Ots79] extrae automáticamente de la información que brinda el histograma, el mejor valor para umbralizar la imagen.

El histograma normalizado de una imagen puede entenderse como una función de densidad de probabilidad discreta:

$$p_q(r_q) = \frac{n_q}{n} \quad q = 0, 1, 2, \dots, L - 1$$

donde n es el número total de píxeles en la imagen, n_q es el número de píxeles que tienen un nivel de intensidad r_q , y L es el número total de niveles de intensidad posibles en la imagen.

Ahora bien, supongamos que escogemos un umbral k tal que divide la imagen en dos conjuntos:

- C_0 es el conjunto de píxels con niveles $[0, 1, \dots, k-1]$
- C_1 es el conjunto de píxels con niveles $[k, k+1, \dots, L-1]$

El método de Otsu elige el valor del umbral k que minimiza la *covarianza* σ_B^2 , definida como:

$$\sigma_B^2 = \omega_0 (\mu_0 - \mu_T)^2 + \omega_1 (\mu_1 - \mu_T)^2$$

donde:

$$\omega_0 = \sum_{q=0}^{k-1} p_q(r_q)$$

$$\omega_1 = \sum_{q=k}^{L-1} p_q(r_q)$$

$$\mu_0 = \sum_{q=0}^{k-1} qp_q(r_q)/\omega_0$$

$$\mu_1 = \sum_{q=k}^{L-1} qp_q(r_q)/\omega_1$$

$$\mu_T = \sum_{q=0}^{L-1} qp_q(r_q)$$

Para ilustrar el desempeño, en la Figura 6.14b) se muestra el resultado cuando el algoritmo se aplica a la imagen de amplitud de un holograma reconstruido en foco (Figura 6.14a)), mientras que en la Figura 6.14d) se muestra el resultado tras aplicar el algoritmo a las imágenes de fase desenvuelta (Figura 6.14c)) del mismo holograma. Notar que incluso en este caso en el que el holograma no es de buena calidad, el algoritmo responde satisfactoriamente con la imagen de fase. En tanto, la escasa información que provee la imagen de amplitud imposibilita que el algoritmo logre segmentar de manera aceptable los objetos del fondo. Este resultado evidencia nuevamente las virtudes de MHD frente a la microscopía convencional.

El desempeño del algoritmo en las imágenes de amplitud merece un comentario adicional. En general, la mayoría de los microorganismos y especímenes biológicos son transparentes. En el caso del ejemplo de la microalga de la Figura 6.14 además se suma el inconveniente de que dada su gran longitud y tamaño las distintas partes del espécimen se enfocan distintas a distancias de enfoque. Por lo tanto, todo el espécimen no puede enfocarse en simultáneo. El problema se agrava cuando se utilizan objetivos de microscopio de mayor potencia que usualmente proveen una menor profundidad de campo. Desde este punto de vista la extracción de la ROI en las imágenes de amplitud resulta claramente improbable, a menos que se utilice una

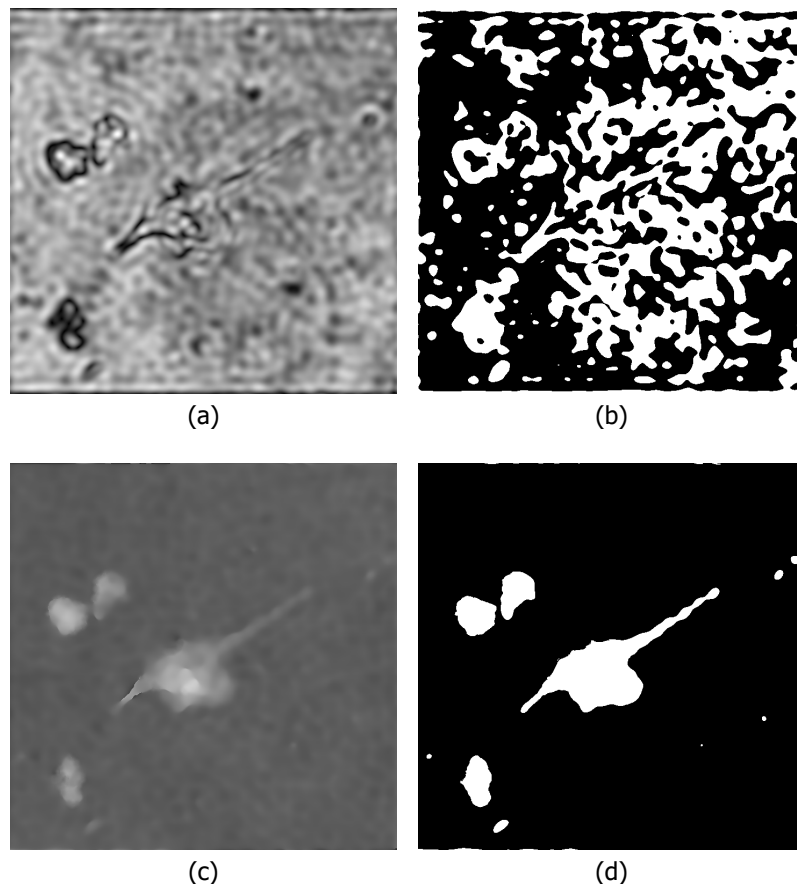


Figura 6.14.: Resultado de umbralizar de acuerdo al valor obtenido con Otsu. a) mapa de módulo; b) mapa umbralizado (invertido para facilitar la comparación); c) mapa de fase desenvuelta del mismo holograma, y d) es su correspondiente versión binarizada. Ambos mapas fueron pre-procesados con máscara de desenfoque para mejorar el contraste objeto-fondo.

combinación de imágenes de amplitud del mismo espécimen enfocado en distintas regiones del mismo.

Cabe aclarar también que ambas imágenes son pre-procesadas para mejorar la discriminación de los objetos en primer plano del fondo. Para ello, se corrigen las aberraciones con los métodos que se discuten en el Capítulo 7. Por otro lado, se aplica una «máscara de desenfoque»; es decir se resta a la imagen, una imagen auxiliar que surge de aplicar a la imagen de un filtro espacial tal como un filtro gaussiano o un filtro de la media (típicamente se usa un filtro gaussiano); este tipo de máscaras se utiliza con frecuencia en el contexto de la fotografía para lograr un aumento en la nitidez y el contraste de las imágenes.

6.5.2. Segmentación por detección de bordes

Consideremos a una imagen como una función matemática $f(i, j)$ que asigna un valor de intensidad f a cada píxel de la imagen (i, j) . Por simplicidad, supongamos que la intensidad se expresa en niveles de gris de 0 a 255. Un borde en la imagen representa una discontinuidad en la función matemática, ya que implica un cambio abrupto en los niveles de gris en esa región de la imagen.

En procesamiento de imágenes, la forma más simple de buscar una discontinuidad consiste en correr por toda la imagen una pequeña máscara diseñada para detección de bordes. Esto matemáticamente es equivalente a hacer una correlación entre la máscara y la imagen. Por ejemplo, para una máscara de 3×3 , este procedimiento consiste en computar la suma de los productos punto a punto de los 9 coeficientes de la máscara con los niveles de intensidad contenidas en la región que abarca la máscara. Esto es, la respuesta R de la máscara en cualquier punto de la imagen está dado por:

$$R = w_1 z_1 + w_2 z_2 + \dots + w_9 z_9 = \sum_{i=1}^9 w_i z_i$$

donde z_i es la intensidad del píxel asociado con el coeficiente de la máscara w_i . La respuesta de la máscara está definida con respecto a su centro.

Los algoritmos de detección de bordes en una imagen, i.e. detección de discontinuidades en los valores de intensidad, hacen uso de las derivadas de primer y segundo orden. Para funciones bidimensionales, como lo son las imágenes, la derivada de primer orden para cada componente rectangular x e y queda sintetizada en las derivadas parciales del *gradiente* de $f(x, y)$, dado por el vector:

$$\nabla f = \left(\frac{\partial f}{\partial x}, \frac{\partial f}{\partial y} \right)$$

cuya magnitud es:

$$\nabla f = \sqrt{\left(\frac{\partial f}{\partial x} \right)^2 + \left(\frac{\partial f}{\partial y} \right)^2} = \sqrt{(G_x)^2 + (G_y)^2}$$

Para simplificar, a menudo se omite la raíz cuadrada:

$$\nabla f \approx (G_x)^2 + (G_y)^2$$

Esta operación dará cero en regiones de intensidad constante, y sus valores serán proporcionales al grado de variación de intensidad en las regiones cuyos valores sean variables; en particular, será máxima en los bordes. Una propiedad fundamental del vector gradiente es que apunta en la dirección de la máxima razón de crecimiento de f en las coordenadas (x, y) . El ángulo al cual esto ocurre es:

$$\alpha(x, y) = \tan^{-1} \left[\frac{G_y}{G_x} \right]$$

Por su parte, la derivada de segundo orden de una función $f(x, y)$ se computa con el *Laplaciano*:

$$\nabla^2 f = \frac{\partial^2 f}{\partial x^2} + \frac{\partial^2 f}{\partial y^2}$$

El laplaciano rara vez es usado como máscara para detección de bordes pues es especialmente susceptible al ruido y produce bordes dobles, aunque puede usarse como un complemento poderoso junto a otros métodos abocados a la detección de bordes.

Con el basamento previamente descrito, la idea detrás de la detección de bordes es la de encontrar lugares donde la intensidad cambia rápidamente, usando alguno de los siguientes criterios:

1. Encontrar lugares donde la primera derivada de la intensidad es mayor en magnitud que un umbral pre-establecido.
2. Encontrar lugares donde la segunda derivada de la intensidad tiene un cero.

Existen diversos métodos que se apoyan sobre estas ideas para detectar bordes, tales como SOBEL, PREWITT, ROBERTS, *Laplaciano de una Gaussiana*, *zero crossing* y CANNY. El más eficiente y preferido es Canny, y es el que implementaremos a continuación.

6.5.2.1. Detección de Bordes por Canny

El detector de CANNY (1986) [Can86] es un detector de bordes muy poderoso. El método puede resumirse así:

1. La imagen que se quiere segmentar se suaviza usando un filtro Gaussiano con una desviación estándar σ con el fin de reducir el ruido (máscara de desenfoque).
2. Se calcula el módulo del gradiente local $\nabla f = \sqrt{G_x^2 + G_y^2}$ y la dirección de los bordes punto a punto $\alpha(x, y) = \arctan(G_y/G_x)$. Se dice que un punto de la imagen forma parte del borde si su intensidad es un máximo local de su entorno en la dirección del gradiente.
3. Los bordes encontrados en el ítem anterior son evaluados para descartar posibles bordes espurios. Para ello, se establecen dos umbrales, un umbral blando y un umbral duro, T_1 y T_2 , con $T_1 < T_2$:
 - a) Los píxeles cuyos valores de gradiente son mayores a T_2 se establecen como bordes y se denominan píxeles «fuertes» o «duros».
 - b) Los que se encuentran entre T_1 y T_2 se dicen píxeles «débiles»

Como criterio se supone : $T_2 = 2,5T_1$.

4. Finalmente, el algoritmo incorpora o descarta los píxeles débiles como bordes clasificándolos en base a su conectividad con los píxeles fuertes. Por lo general, une los bordes fuertes incorporando los píxeles «débiles» que se encuentran conectados por un entorno de 8 píxeles. Como resultado, se obtiene una imagen con bordes fuertes.

Aún cuando este algoritmo se cataloga dentro de los más eficientes para la detección de bordes tiene algunos inconvenientes que atienen a la correcta elección de los umbrales T_1 o T_2 . Si estos no se eligen correctamente el algoritmo puede sobrestimar o subestimar la cantidad de bordes en la imagen. Para nuestros propósitos, el resultado deseado es aquel que arroja bordes que se corresponden con los objetos (entendiéndose como objeto cualquier elemento que no corresponda al fondo).

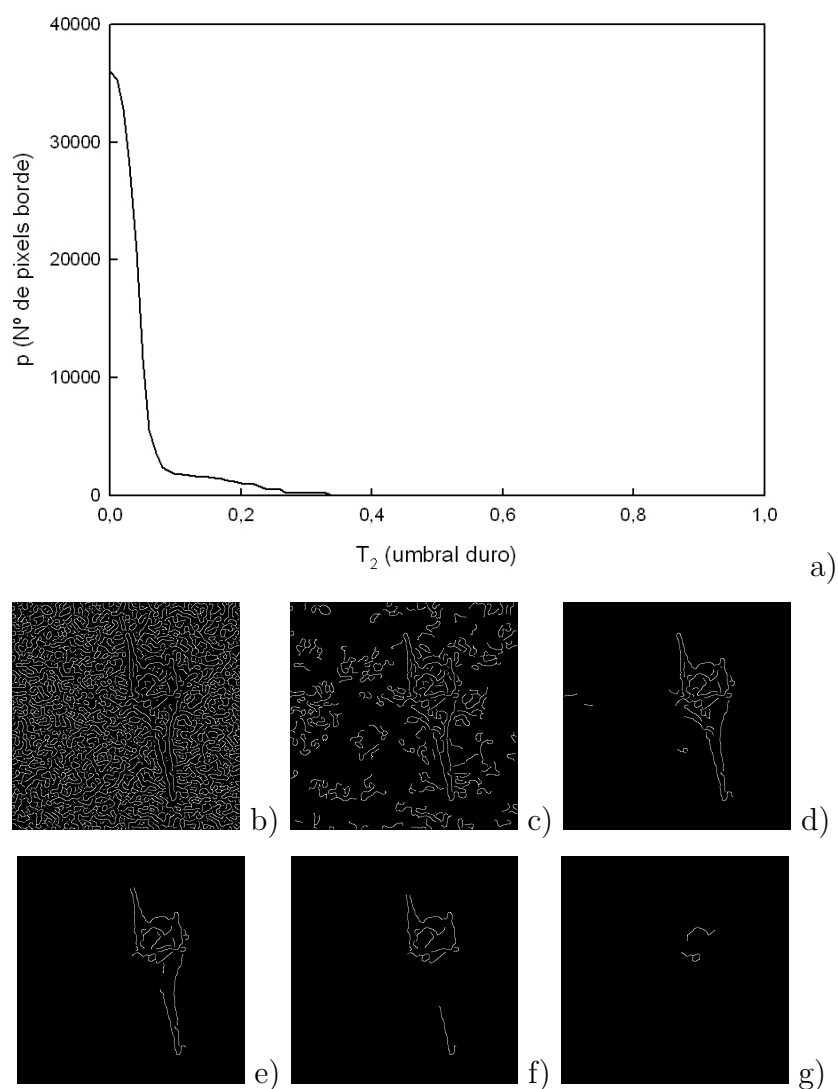


Figura 6.15.: a) Relación de acuerdo a Canny entre p y T_2 , con $T_1 = T_2/2,5$; imágenes obtenidas para T_2 igual a b) 0; c) 0.05; d) 0.09; e) 0.15; f) 0.20; g) 0.30

Con el fin de, independientemente del tamaño de la imagen, no subestimar o sobrestimar la cantidad de bordes de la imagen con el algoritmo, se observa el comportamiento del promedio de píxeles que devuelve como bordes el algoritmo, denotado con p , en función del umbral fuerte T_2 ; un ejemplo se exhibe en la Figura 6.15.

Se examinan diversas imágenes, de distintos tamaños y con diferentes objetos (de diversa forma y tamaño). Claramente, a medida que aumenta el tamaño de la imagen, aumenta el número de píxeles p_b que se desea sean detectados como bordes. Del análisis exhaustivo sobre varias imágenes holográficas surge que el mejor desempeño del algoritmo se manifiesta cuando se utiliza un filtro gaussiano con una desviación estándar σ igual a 3 o 4 y un umbral duro de 0.075.

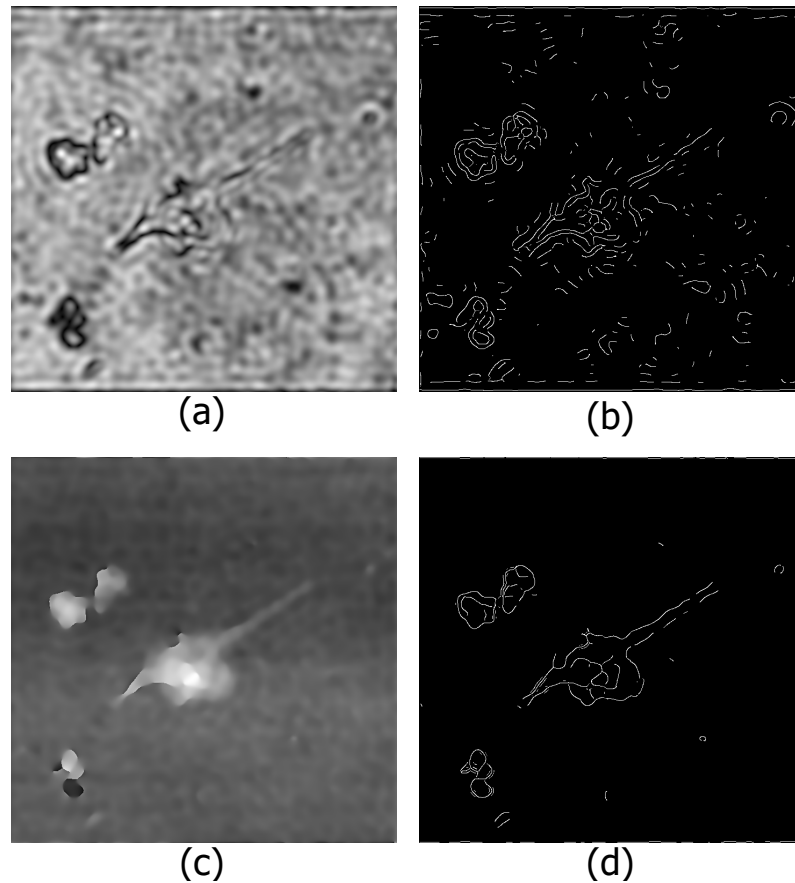


Figura 6.16.: Ilustración del desempeño de Canny: a) Módulo del holograma; b) Detección de bordes de a); c) Fase desenvuelta del holograma; d) Detección de bordes de c).

En la Figura 6.16 se muestran los resultados para el mismo holograma con el que se ensayó el método de Otsu en la sección anterior. Nuevamente, los resultados que se obtienen con la fase desenvuelta, superan ampliamente en calidad a los obtenidos con el módulo.

6.5.3. Discusión

De la comparación de los resultados obtenidos mediante los algoritmos estudiados para la extracción de la ROI, se prefiere el método de Otsu pues devuelve una máscara binaria que puede multiplicarse punto a punto sobre los mapas de fase desenvuelta para distinguir las contribuciones de fase que introducen los microorganismos y excluir el resto, con el fin de computar biovolumen.

7. Métodos para la corrección de Aberraciones

Debido a la arquitectura y al montaje experimental empleados para el registro de los hologramas, surgen naturalmente un conjunto de aberraciones en la fase de los mismos. En relación con este aspecto, los principales factores involucrados son tanto la inclinación de la onda de referencia producto de la geometría fuera de eje, como la introducción de un OM en el camino de la onda objeto para incrementar la resolución espacial. En lo que concierne al primer caso, en la Subsección 4.2.6 se discutió la propuesta de Cuche *et al.* [CBD99] para la corrección del efecto. En cuanto a la aberración esférica de fase, no se ha enfatizado hasta aquí su importancia.

Por otro lado, cuando se registran los hologramas con un sensor CMOS, en vez de un CCD, aparece una aberración adicional ligada al efecto *rolling shutter* (o persiana) propio del método de adquisición de imágenes, y que se observa usualmente como un patrón de ondulaciones horizontales espurias en las imágenes de fase.

La importancia de la corrección de estas aberraciones radica en la posibilidad concreta de acceder a la información fidedigna del espécimen para lograr los dos objetivos concretos de esta Tesis: por un lado, poder cuantificar biovolumen, y por otro, tratar de identificarlo. Para ambos casos, las aberraciones constituyen un considerable obstáculo. Es por ello que el presente capítulo está abocado por un lado a profundizar en estos aspectos, y por otro a la propuesta de metodologías originales con el objetivo de corregir aberraciones automáticamente.

7.1. Aberración por la geometría fuera de eje

Tal como se explicó, en las configuraciones fuera de eje (Subsección 3.1.3) el haz de referencia llega al sensor formando un pequeño ángulo respecto a la dirección de propagación de la onda objeto, lo cual permite separar espacialmente las tres ondas difractadas en el proceso de reconstrucción. Para obtener acceso cuantitativo a la fase, debe simularse correctamente la contraparte numérica del haz de referencia durante el proceso de reconstrucción, tal como propuso [CBD99] y se discutió en la Subsección 4.2.6. La inclinación del haz de referencia numérico depende de los cosenos directores, dos parámetros que deben ajustarse de tal modo que la dirección de propagación del mismo coincida lo mejor posible con la dirección del haz de

referencia experimental. Un error en la determinación de la inclinación del haz de referencia introduce una distorsión de fase en el plano de reconstrucción.

Hasta el momento, y como se explicó previamente, este proceso era realizado por prueba-error, ya que no se contaba con un método automático de ajuste. Consistía en variar ambos parámetros hasta que hubiera coincidencia en la parte real del haz de referencia numérico con las franjas de interferencia del holograma. Un método automático de ajuste para la determinación de los cosenos directores implica no sólo aumentar considerablemente la eficacia del algoritmo, sino también otorgarle precisión teórica al mismo. En esta sección se propone un método para la determinación automática de los cosenos directores a partir de la información que puede extraerse del espectro del holograma.

Asimismo, realizando un análisis exhaustivo de la problemática subyacente a la aberración por geometría fuera de eje, se introduce como solución alternativa un método *automático* que traslada la frecuencia portadora de la imagen virtual al centro del espectro. Este mecanismo corrige completamente la aberración introducida por la geometría fuera de eje; además, dada su simplicidad, es el método que se adoptará en los ensayos experimentales siguientes.

7.1.1. Determinación automática de la inclinación del haz de referencia

Cuche *et al.* [CBD99] establecieron que si bien la forma matemática del haz de referencia no tiene incidencia en la calidad de las imágenes de amplitud obtenidas, las imágenes de fase se ven notablemente distorsionadas si el haz de referencia digital R_D no se simula correctamente. La onda de referencia está correctamente computada cuando es una réplica exacta de la onda de referencia experimental E_R usada en la etapa de registro, lo que hace posible recuperar la onda objeto E_O sin ambigüedad a partir del tercer término (imagen virtual) que constituye el holograma. Así, la fase de la onda objeto se recupera sin distorsión; en caso contrario, la información de la onda objeto se encuentra «montada» sobre la diferencia de fase entre la onda de referencia digital y la onda de referencia experimental.

Bajo la suposición de que el holograma se registró fuera de eje con una onda de referencia plana E_R de longitud de onda λ , la Ecuación 4.1 da el modelo teórico de R_D , donde $\cos\alpha$ y $\cos\beta$ son los cosenos directores que definen la dirección de propagación. Como la onda de referencia digital se encuentra dentro de la integral de Fresnel, cada vez que se ajustan los parámetros $\cos\alpha$ y $\cos\beta$, y luego se realiza una transformación Fourier de $I_H R_D$, los tres órdenes cambian de ubicación en el plano de la transformada; en particular también lo hace el orden de interés. Para cada ensayo del par de parámetros, el acceso a la fase involucra la realización de todas las operaciones matemáticas que involucran la reconstrucción del holograma, sin la garantía de haber escogido los parámetros adecuadamente. El costo computacional es muy alto y el proceso es extremadamente lento. Por lo tanto, el ajuste manual

de estos parámetros es una tarea engorrosa que demanda experticia e, idealmente, conocimiento previo de sus valores.

Cabe notar, sin embargo, que cuando se realiza la Transformada de Fourier al holograma I_H , los tres órdenes del espectro, el orden cero en el centro, y los órdenes laterales: imagen real e imagen virtual, aparecen espacialmente bien diferenciados, tal como se ilustró en la Figura 6.5. La separación entre los mismos es tanto mayor cuanto mayor es el ángulo entre el haz de referencia y el haz objeto. En consecuencia, el espectro del holograma brinda información directa de la inclinación del haz de referencia experimental, por lo que puede ser usado para calcular exactamente los cosenos directores de la contraparte digital.

Sin pérdida de generalidad, se puede suponer que el interés está puesto en la imagen virtual. El espectro de este término en el holograma puede calcularse mediante (Teorema de la Convolución):

$$\mathfrak{F}\{E_O E_R^*\} = \mathfrak{F}\{E_O\} \otimes \mathfrak{F}\{E_R\} \quad (7.1)$$

Además, si el holograma se registró con una onda plana, es fácil demostrar que la Transformada de Fourier del haz de referencia:

$$\mathfrak{F}\{E_R\} = \delta\left(f_x + \frac{\cos\alpha}{\lambda}, f_y + \frac{\cos\beta}{\lambda}\right) \quad (7.2)$$

donde $\mathfrak{F}\{\cdot\}$ representa la Transformada de Fourier, \otimes denota la operación de convolución, λ es la longitud de onda del láser empleado, y (f_x, f_y) denotan las coordenadas en el dominio del espectro (que se encuentran relacionadas con el dominio espacial). Claramente, de la Ecuación 7.1 y la Ecuación 7.2 se advierte que el orden de interés en el espectro es la convolución de una función impulso delta δ y el espectro del objeto. La posición de la función δ representa la frecuencia portadora del término de interés, y por su naturaleza impulsiva representa un *máximo* en el espectro del holograma. Esta frecuencia da una medida la inclinación de la onda difractada. Como consecuencia, al identificar la frecuencia portadora de la imagen virtual (f_{x_V}, f_{y_V}) , es posible determinar la inclinación del haz de referencia con el cual se registró el holograma y, por lo tanto, calcularse fácilmente de acuerdo a la Ecuación 4.1:

$$\cos\alpha = \lambda f_{x_V} \quad \cos\beta = \lambda f_{y_V} \quad (7.3)$$

La ubicación automática de los máximos en el espectro se hace mediante la metodología propuesta en la Subsección 6.3.1. Conociendo las coordenadas de los máximos, la frecuencia portadora puede conocerse con facilidad y el cálculo de los cosenos directores mediante Ecuación 7.3 es trivial y automática. Con esto es posible corregir automáticamente la aberración inducida por la inclinación del haz de referencia.

7.1.2. Centrado del orden a reconstruir

Si bien en nuestros ensayos con el método PEA y el de la convolución, se tomó la decisión con bases intuitivas de centrar el orden del espectro que se desea recons-

truir, Cui *et al.* [CWW⁺11] y Colomb *et al.* [CMK⁺06] justifican esta decisión con fuertes bases teóricas. En las experiencias preliminares del Capítulo 4, el centrado, tanto para el método PEA como para el método de la convolución, fue realizado manualmente y «a ojo». Para ello, se estimaba la posición del máximo del orden de interés en el espectro, se construía la máscara cuadrada centrada en ese máximo y se desplazaba el orden al centro de coordenadas. Con este procedimiento, la aberración debida a la inclinación del haz de referencia no se eliminaba completamente: en ambos métodos prevalecían numerosos saltos de fase en la fase envuelta que denotaban que la fase real del espécimen se encontraba montada sobre un plano (Ver Figura 4.21 y Figura 4.22). En el método de la convolución, además de los saltos de fase, la imagen no aparecía centrada en la ventana.

De la Ecuación 7.1 y la Ecuación 7.2 se sigue que al centrar el orden que se desea reconstruir, se elimina la aberración en la fase debida a la inclinación del haz de referencia producto de la geometría fuera de eje. Esto suprime la necesidad de computar un haz de referencia numérico. En particular, Colomb *et al.* aplican el procedimiento de manera manual sobre la amplitud del espectro; por su parte, el procedimiento propuesto por Cui *et al.*, consiste en calcular el argumento del espectro del holograma (esto es, el ángulo o fase del espectro) y ubicar la posición de la frecuencia portadora de la imagen virtual que coincide con el máximo en el argumento. La aberración en la inclinación se corrige moviendo el filtro aplicado al orden de interés hacia el origen de coordenadas del dominio de las frecuencias. Sin embargo, el método presenta una desventaja; dado que opera sobre el argumento del espectro, éste naturalmente se encuentra envuelto producto de la naturaleza de la función arcotangente. Por lo tanto, para poder encontrar el máximo se precisa de la aplicación de un algoritmo de desenrollamiento sobre el espectro, cuyo éxito queda supeditado a que el algoritmo de desenrollamiento empleado recupere el argumento correctamente.

Con base en estas consideraciones, se propone una alternativa *automática* que no requiere la aplicación de un algoritmo de desenrollamiento. El método consiste en centrar el orden deseado a partir del *módulo del espectro* del holograma. La identificación automática del orden se sigue del procedimiento descrito en Subsección 6.3.1. Los resultados se muestran en la Figura 7.1 en donde se exhiben las imágenes de contraste de fase obtenidas mediante el método PEA de hologramas de la microalga *C. hirundinella*. Cuando el orden de interés no es centrado, los numerosos saltos de fase en la Figura 7.1a) dan cuenta de la inclinación del haz de referencia; la información de fase de la onda objeto se torna inaccesible ya que se encuentra «montada» sobre el plano de fase relacionado con la inclinación del haz de referencia. Por el contrario, al desplazar la frecuencia portadora al centro del espectro del holograma, la imagen de contraste de fase presenta un fondo más o menos uniforme, lo que da cuenta de la corrección de la aberración.

El éxito del método está sujeto a que pueda detectarse la frecuencia portadora de interés. Esto no ocurre cuando el haz objeto y el haz de referencia presentan curvaturas diferentes; en ese caso, el patrón de franjas de los hologramas registrados presenta una curvatura considerable, y la frecuencia portadora del orden de interés

ya no es una función δ y su detección se torna dificultosa. En general, cuando se emplean OM de potencia de 10X en adelante, la detección del máximo resulta sencilla.

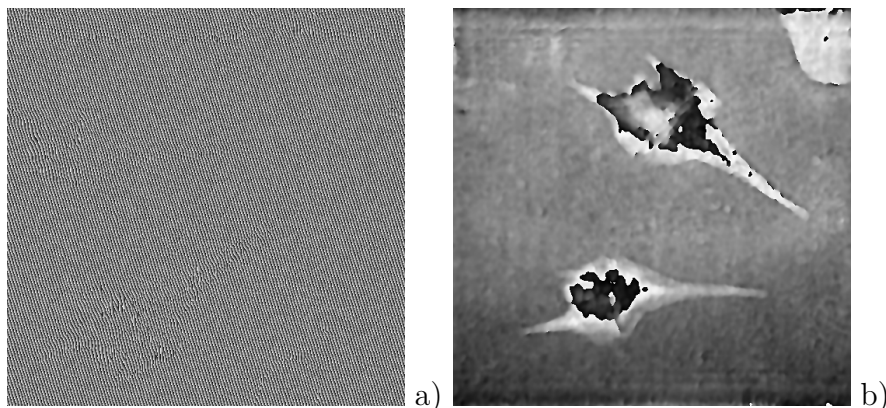


Figura 7.1.: Fase módulo 2π de un mismo holograma, a) obtenida sin centrar el espectro y b) obtenida luego de haber centrado el espectro.

Cabe destacar que tanto Colomb *et al.* como Cui *et al.* reconstruyen los hologramas operando con el método de Fresnel o el de la convolución; las desventajas de estos métodos ya fueron analizados en la Subsección 4.2.7. Particularmente, el método de Fresnel requiere de mayor costo computacional cuando se filtra el orden de interés, ya que demanda la aplicación de una Transformada de Fourier para computar el espectro del holograma, una Transformada inversa una vez que se ha aplicado y desplazado el filtro al origen de coordenadas y una Transformada adicional para realizar la propagación. Los resultados expuestos en esta sección se limitan al método PEA, teniendo en cuenta las bondades ya descritas.

7.2. Método automático para la corrección de la aberración esférica en la fase

7.2.1. Introducción

En MHD, la introducción de un Objetivo de Microscopio (OM) en el arreglo experimental es crucial para mejorar la resolución transversal de la muestra y caracterizar objetos microscópicos. Ahora bien, cuando la luz atraviesa el OM los frentes de onda aproximadamente planos (a menos del retardo de fase que experimentan por el espécimen) se transforman en frentes de onda esféricos. Esta deformación afecta primordialmente la fase del objeto y por lo general no perturba la imagen de amplitud; no obstante, debe corregirse para que pueda extraerse de manera precisa la información propia de la muestra, es decir, el retardo de fase neto que experimenta el espécimen. La solución experimental que se propuso en la Sección 4.1 consiste en

la inserción de un OM idéntico en el brazo del interferómetro que recorre el haz de referencia, a la misma distancia de la salida del interferómetro que el OM del brazo objeto. Sin embargo, la coincidencia perfecta entre las curvaturas entre el haz de referencia y el haz objeto es difícil de lograr en la práctica; en particular, cuando la potencia del OM utilizada es baja, tales como OM con aumentos nominales de 4X, esta solución es ineficiente.

Existen métodos numéricos que remueven la aberración de fase en las etapas de post-procesamiento del holograma. Un método de doble exposición propuesto por Ferraro *et al.* [FDNF⁺03] permite compensar completamente la curvatura del frente de onda, aunque requiere del registro de un holograma adicional sin la muestra, y de un control minucioso de las condiciones experimentales, ya que es fuertemente susceptible a ruidos y vibraciones externas. Cuche *et al.* [CMD99], proponen un método digital que permite la corrección mediante la multiplicación del frente de onda reconstruido con una máscara de fase compleja digital, con un único parámetro de ajuste. El problema que surge de este modelo, aunque físicamente correcto, es que el parámetro en cuestión debe ajustarse manualmente hasta que la curvatura se «visualice» corregida. Esto, además de ser un método subjetivo, requiere gran experticia o bien un conocimiento *a priori* de su valor. La demanda de tiempo que involucra esta tarea le quita practicidad, eficacia y robustez al método. Además, dicho parámetro debe modificarse manualmente para cada nueva configuración experimental, ya sea si se modifica el OM utilizado o la posición de la cámara.

En la literatura existen reportes de una vasta tarea realizada para automatizar la corrección de la aberración esférica. En particular, Colomb *et al.* [CCC⁺06, CMK⁺06], proponen computar una máscara de fase polinomial, llamada *Lente Numérica Paramétrica*, cuyos parámetros se ajusten automáticamente sin previo conocimiento de sus valores físicos. Ésta corrige simultáneamente la inclinación del haz de referencia y aberraciones de orden superior y puede ubicarse tanto en el plano del holograma como en el plano imagen.

La propuesta requiere fijar los parámetros de polinomios estándar, de modo que se ajusten a determinados perfiles extraídos de la distribución de fase reconstruida, en zonas en donde la misma se suponga constante; alternativamente, en la referencia [CCC⁺06] se utilizan polinomios de Zernike, cuyos parámetros se ajustan sobre *superficies bidimensionales* extraídas de áreas de la fase reconstruida que se suponen planas. Dichas zonas sirven como referencia de las aberraciones naturales de la configuración experimental, sin tener en cuenta el retardo de fase que introduce el objeto. En general, para que el algoritmo funcione adecuadamente se precisa la calibración con un objeto plano, lo que demanda el registro de un holograma adicional. De cualquier modo, el polinomio con los parámetros adecuados se arregla en una máscara de fase, que se ubica ya sea en el plano del holograma y/o en el plano imagen. Si la corrección se considera deficiente, el algoritmo se aplica de manera iterativa. El inconveniente de esta alternativa radica en la gran cantidad de operaciones matemáticas que deben efectuarse, con un consecuente elevado costo computacional. A modo de resumen, se enumeran los pasos involucrados:

1. Reconstrucción del holograma sin corrección de las aberraciones
2. Desenvolvimiento de fase en los perfiles unidimensionales o superficies bidimensionales seleccionados
3. Ajuste de los parámetros del polinomio
4. Multiplicación del frente de onda reconstruido y/o del holograma por la máscara de fase polinomial con los parámetros obtenidos
5. Por último, obtención de módulo y fase corregidos.

Cabe remarcar que en este proceso el punto más controvertido involucra la elección de los perfiles o superficies más adecuados para desenvolver sobre el mapa de fase; tarea que debe realizarse manualmente y cuyo criterio puede no ser adecuado. Por otro lado, pueden aparecer aberraciones residuales debido a un mal desempeño del algoritmo de desenvolvimiento. Más aún, para el caso de la referencia [CCC⁺06] en el que se desenvuelven perfiles unidimensionales, el resultado del proceso de desenvolvimiento podría resultar inconsistente: por lo analizado en el Capítulo 5, podría no haber concordancia al comparar el perfil obtenido al desenvolver una línea aislada respecto a la misma línea extraída del mapa bidimensional desenvuelto.

En un trabajo posterior [CKC⁺06], se introduce el concepto de *holograma de referencia conjugado* y el de *auto-holograma de referencia conjugado*, a partir de los cuales es posible eliminar completamente las aberraciones. En el primer caso, se requiere del registro de un holograma adicional *blanco* (sin la muestra), mientras que en el segundo el mismo holograma puede utilizarse como holograma de referencia mediante un análisis de frecuencias en el plano de Fourier. Para ello, se realiza un filtrado pasa-bajos en el espectro del holograma, lo que elimina satisfactoriamente la información relacionada con el espécimen. Con esta última alternativa se logran resultados más que satisfactorios. No obstante, durante el proceso de filtrado es difícil distinguir entre las frecuencias asociadas al objeto de las frecuencias asociadas a la aberración, debido a la ineludible superposición en sus bandas de frecuencia.

Por su parte, Miccio *et al.* [MAG⁺07] proponen corregir la aberración no deseada a partir de un ajuste bidimensional con polinomios de Zernike sobre toda la fase desenvuelta reconstruida. Para ello restan el polinomio resultante del mapa de fase original. En esta misma línea, Di, J. *et al.* [DZS⁺09b], describen un método de compensación de la aberración de fase usando cuadrados mínimos; en el mismo, se requiere el ajuste por cuadrados mínimos de una superficie parabólica teórica a la superficie de fase continua del holograma. Para disminuir el costo computacional del método, se extrae una submatriz del mapa de fase desenvuelto y se ajusta la superficie parabólica teórica a la superficie formada por la submatriz. No obstante, en relación con este último aspecto, no queda bien establecido el criterio del tamaño óptimo de la submatriz elegida, con lo cual los resultados serán más o menos satisfactorios según el número de puntos elegidos para conformar la submatriz. En este sentido, el método también requiere de un proceso por «prueba-error». Nuevamente, ambos métodos exigen aplicar algún algoritmo de desenvolvimiento de fase, y los

resultados se encuentran sujetos a las bondades del algoritmo empleado para este fin.

En resumen, si bien todos estos métodos logran corregir la aberración esférica satisfactoriamente, presentan como inconvenientes más relevantes la necesidad, por un lado, de registrar un holograma adicional, y por otro, de emplear métodos de desenvolvimiento de fase. Dado que los algoritmos de desenvolvimiento pueden producir artefactos no necesariamente relacionados con las aberraciones físicas, cualquier ajuste que se realice a partir de los mapas de fase desenvuelta propagará los errores del método a la corrección de la aberración.

De acuerdo con lo expuesto, en esta tesis se propone un método simple, rápido y automático para corregir la aberración esférica, cuya principal ventaja es que trabaja con el mapa de fase envuelto (con lo cual no se introducen errores intrínsecos de los métodos de desenvolvimiento), al mismo tiempo que no requiere del ajuste manual de ningún parámetro, ni de la elección de zonas de referencia.

7.2.2. Principios

Si asumimos que el OM se comporta como una lente delgada, ésta retrasa un frente de onda incidente en una cantidad proporcional al espesor de la lente en cada punto.

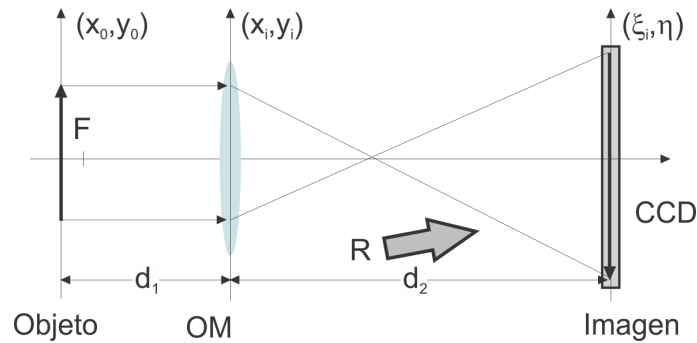


Figura 7.2.: Relación entre la muestra y su imagen en el proceso de registro holográfico

La Figura 7.2 muestra la relación entre la muestra en el plano objeto x_0y_0 , y su imagen en el plano imagen $\xi\eta$ cuando se ubica un OM en el plano x_iy_i . Para un sistema formador de imágenes de este tipo, la amplitud compleja de la onda objeto E_O en el plano $\xi\eta$ puede expresarse según la Ecuación 2.14:

$$U(\xi, \eta) = \int_{-\infty}^{\infty} \int_{-\infty}^{\infty} E_O(x_0, y_0) h_1(\xi, \eta, x_0, y_0) dx_0 dy_0$$

donde E_O es la amplitud compleja de la onda objeto en el plano x_0y_0 y h_1 es la función de punto extendido en el proceso formador de imágenes.

Ahora bien, supongamos que el plano objeto y el plano imagen están relacionados por

$$\frac{1}{d_1} + \frac{1}{d_2} = \frac{1}{f}$$

d_1 y d_2 son las distancias desde el plano $x_i y_i$ al plano $x_0 y_0$ y $\xi \eta$ respectivamente. En un sistema formador de imágenes perfecto con aumento $M = \frac{d_2}{d_1}$, un punto de coordenadas (x_0, y_0) en el plano objeto se transforma en un punto de coordenadas $(\xi = -Mx_0, \eta = -My_0)$ en el plano imagen. Bajo esta suposición, la función de punto extendido h_1 está dada por [Goo68]:

$$h_1(\xi, \eta, x_0, y_0) = C \exp \left[\frac{i\pi}{\lambda d_2} \left(1 + \frac{d_1}{d_2} \right) (\xi^2 + \eta^2) \right] \delta \left(\xi + \frac{d_2}{d_1} x_0, \eta + \frac{d_2}{d_1} y_0 \right) \quad (7.4)$$

con λ la longitud de onda del láser y C una constante. De esta expresión se sigue que el campo en el plano imagen es una réplica aumentada del campo en el plano objeto, multiplicado por un término de fase parabólica que se puede interpretar como una aproximación cuadrática a una onda esférica (ver Ecuación 2.7). En este sentido, resulta válido aseverar que, bajo las aproximaciones realizadas, un OM realiza un mapeo de una onda plana incidente en una onda esférica.

En el contexto de la MHD, la muestra es iluminada con una onda plana, que al atravesar la muestra retarda ligeramente su fase en las zonas en las que se encuentra el espécimen bajo estudio; así, la onda objeto E_O es una onda que difiere ligeramente de una onda plana debido a la muestra utilizada. Sin embargo, cuando la misma atraviesa el OM, éste introduce la aberración esférica de fase, dada por la Ecuación 7.4, que debe corregirse para recuperar la fase de la onda objeto E_O sin distorsión. Como resultado, la introducción de un OM en el arreglo experimental trae aparejado que la fase obtenida al reconstruir el holograma se encuentre «montada» sobre una superficie parabólica.

En particular, para muestras con especímenes biológicos (tales como los que se emplean en esta Tesis) las aberraciones de fase debidas al OM pueden llegar a ser significativas, pero varían lentamente; mientras, las fluctuaciones de fase introducidas por el espécimen son pequeñas pero varían rápidamente, por lo que pueden ser consideradas como una ligera perturbación en comparación con la aberración introducida por el OM. Luego, puede considerarse que la fase de la onda objeto, $\Phi(\xi, \eta)$, está compuesta por dos contribuciones aditivas: la fase ideal del espécimen bajo estudio, $\Phi_{\text{especimen}}(\xi, \eta)$, y una perturbación debida a la aberración esférica, $\Phi_{\text{error}}(\xi, \eta)$. Bajo esta suposición, y teniendo en cuenta la Ecuación 7.4, si se desprecian las aberraciones de orden superior, la aberración relacionada con la curvatura del frente de onda que emerge del OM puede estimarse ajustando la fase desenvuelta del holograma reconstruido a una superficie parabólica:

$$\Phi_{\text{error}}(\xi, \eta) \sim f(\xi, \eta) = a_\xi (\xi - b_\xi)^2 + a_\eta (\eta - b_\eta)^2 + c = 0 \quad (7.5)$$

Al no existir términos cruzados, los coeficientes a_ξ , a_η , b_ξ y b_η pueden identificarse de manera independiente en las direcciones ξ y η ; el parámetro c carece de importancia ya que sólo involucra una «continua» sobre la que se encuentra montada la superficie parabólica. Así, sustrayendo la superficie la superficie dada por la Ecuación 7.5 de la fase desenvuelta $\Phi(\xi, \eta)$, se corrige la aberración.

No obstante, como se discutió en la sección anterior, la fase desenvuelta de la imagen reconstruida no necesariamente representa información fidedigna de la fase. Más aún, del Capítulo 5 se depende que los algoritmos de desenvolvimiento globales suelen arrojar resultados muy diferentes a los de algoritmos de desenvolvimiento por un camino particular. Por el contrario, la información de la *fase envuelta* resulta de la naturaleza física *per se*, de modo que en esta Tesis se propone corregir la curvatura de fase a partir de la información que provee dicho mapa, evitando la aplicación de algoritmos de desenvolvimiento de fase.

Al menos en un sentido teórico, el gradiente del mapa de fase continuo (desenvuelto) coincide con el gradiente del mapa de fase envuelto módulo 2π en todo punto salvo en las discontinuidades que presenta la fase envuelta. Considerando $\Phi_{\text{especimen}}(\xi, \eta)$ como una pequeña perturbación, el gradiente de la fase desenvuelta, $\nabla\Phi$, puede aproximarse al gradiente de la Ecuación 7.5:

$$\nabla f = (2a_\xi [\xi - b_\xi], 2a_\eta [\eta - b_\eta]) = (D_\xi, D_\eta) \quad (7.6)$$

de donde claramente también se pueden obtener los parámetros de interés a_ξ , a_η , b_ξ y b_η .

Sea la fase envuelta obtenida experimentalmente ϕ_w una matriz de $N \times M$, y su gradiente, $\nabla\phi_w = (D_\xi^*, D_\eta^*)$. Sobre las hipótesis planteadas, $\nabla\phi_w$ puede ajustarse al gradiente teórico ∇f en un sentido de mínimos cuadrados, de modo que los parámetros de interés pueden obtenerse sin la necesidad de desenvolver la fase. La Ecuación 7.6 exhibe que, en este caso, el ajuste implica simplemente una regresión lineal en las direcciones ξ e η con las planos teóricos: $A_\xi\xi + B_\xi$ y $A_\eta\eta + B_\eta$, siempre que: $a_\xi = A_\xi/2$, $a_\eta = A_\eta/2$, $b_\xi = -B_\xi/A_\xi$ y $b_\eta = -B_\eta/A_\eta$.

Cabe mencionar, sin embargo, que como la fase envuelta ϕ_w presenta múltiples discontinuidades, su gradiente también y estas ocurren en los mismos puntos en los que la fase envuelta es discontinua. En un ajuste por mínimos cuadrados estas discontinuidades pueden impactar negativamente en la estimación de los parámetros. Para reducirlas, al menos parcialmente, se propone envolver $\nabla\phi_w$ usando el operador $W[\cdot]$. En tal sentido, se denomina *Gradiente Envuelto de la Fase Envuelta (GEFE)*, al resultado de esta operación: $W[\nabla\phi_w] = (W[D_\xi^*], W[D_\eta^*])$, que es el que finalmente deberá ajustarse a la Ecuación 7.6.

Por último, para agilizar el proceso de ajuste y los costos computacionales, en vez de realizar un ajuste bidimensional de $W[D_\xi^*]$ y $W[D_\eta^*]$ a los planos $A_\xi\xi + B_\xi$ y $A_\eta\eta + B_\eta$ respectivamente, se propone un ajuste unidimensional a las rectas teóricas $A_\xi\xi + B_\xi$ y $A_\eta\eta + B_\eta$, a partir de la extracción de perfiles representativos de las matrices $W[D_\xi^*]$

y $W[D_\eta^*]$. Los perfiles elegidos, Γ_ξ y Γ_η , deben contener información suficientemente representativa de ambas matrices; un perfil que arregle la mediana de los valores de cada columna (fila) de $W[D_\xi^*]$ ($W[D_\eta^*]$) se constituye en un perfil que cumple con estos requerimientos ya que se espera que incorpore la información de fase vinculada a la aberración y descarte valores de fase correspondientes al espécimen, siempre que los especímenes bajo estudio en el holograma abarquen pequeñas áreas en relación con el fondo.

7.2.3. Resultados y Discusión

En la Figura 7.3a) se muestra la fase envuelta obtenida al reconstruir un holograma de la microalga del género *Pediastrum* inmersa en un medio acuoso. En ausencia de aberración el fondo debiera visualizarse uniforme, debido a la homogeneidad del medio circundante. No obstante, se advierte claramente la aberración esférica debida al OM, la que se visualiza como saltos de fase de forma más o menos circulares y concéntricas. En este caso particular, en la configuración experimental se usaron dos objetivos de 20X/0.40A.N., uno en el brazo objeto y otro en el de referencia ubicados a distancias diferentes de la salida del interferómetro. Por este último motivo no es posible lograr que las curvaturas de ambos frentes de onda coincidan, por lo que la aberración esférica no se compensa experimentalmente y debe apelarse a un método adicional de corrección.

Aplicando el método aquí propuesto puede corregirse notablemente la aberración, tal como se observa en la Figura 7.3b). Notar que en ambas imágenes de la Figura 7.3 también se observa un patrón ondulatorio horizontal que se corresponde con la aberración introducida por el sensor CMOS con el cual se capturó el holograma correspondiente y que puede influir negativamente en el proceso de ajuste. La corrección de este efecto se reserva para la siguiente sección. Para ilustrar el procedimiento

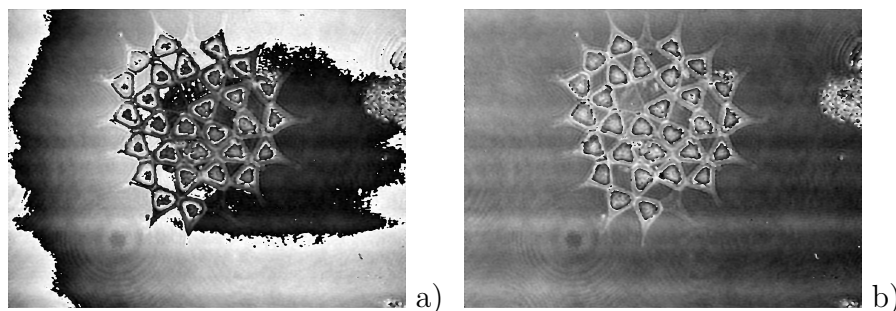


Figura 7.3.: a) Fase envuelta sin corregir obtenida del holograma de la microalga *Pediastrum* b) Fase envuelta obtenida al corregir la aberración esférica con el método propuesto.

completo, la metodología propuesta se resume en los siguientes pasos:

1. Se calcula el gradiente $\nabla\phi_w$ de la fase envuelta ϕ_w dada en la Figura 7.3 , siendo $\nabla\phi_w = (D_\xi^*, D_\eta^*)$. Se obtienen las componentes del gradiente en dos imágenes separadas que se ilustran en la Figura 7.4 a) y b) .

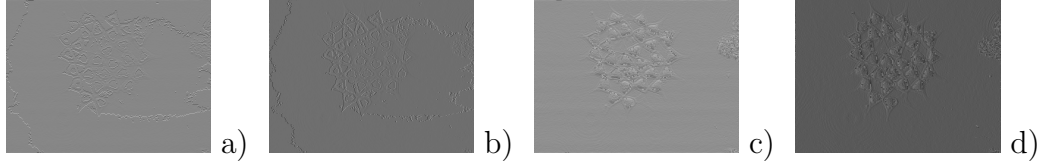


Figura 7.4.: Componentes del gradiente de la fase envuelta a) D_ξ^* b) D_η^* ; GEFE c) $W[D_\xi^*]$ d) $W[D_\eta^*]$

2. Se obtiene *Gradiente Envuelto de la Fase Envuelta (GEFE)* que consta de dos matrices: $W[\nabla\phi_w] = (W[D_\xi^*], W[D_\eta^*])$ (Ver Figura 7.4 c) y d)), donde puede verse que las discontinuidades vinculadas a la aberración han desaparecido.
3. Se obtienen los perfiles Γ_ξ y Γ_η con la información representativa de las matrices anteriores. Para esto, se calcula la mediana de los valores de cada columna (fila) de $W[D_\xi^*]$ ($W[D_\eta^*]$) y se los arregla en un vector Γ_ξ (Γ_η). A modo de ejemplo, en la gráfica de la Figura 7.5a) se representa el perfil Γ_η , el cual muestra una ligera tendencia lineal. Las pronunciadas oscilaciones están relacionadas con la aberración inducida por el efecto CMOS, cuyo tratamiento se reserva para la siguiente sección.
4. Se efectúa la regresión lineal para sendos perfiles y se obtienen los parámetros de interés de acuerdo a lo expuesto en la sección anterior. Para ejemplificar, en la Figura 7.5a) se representa la línea de tendencia lineal ajustada a los datos del perfil Γ_η . Luego, la obtención de la superficie parabólica dada por la Ecuación 7.5 es inmediata y se muestra en Figura 7.5b).
5. Por último, al mapa de fase envuelto ϕ_w , se le resta la superficie parabólica que se obtiene con esas constantes y al resultado se lo envuelve módulo 2π ; como resultado se obtiene el mapa envuelto corregido ya mostrado en la Figura 7.3b).

El método propuesto corrige rápidamente y de manera considerable la aberración esférica; no obstante, la aberración subyacente relacionada con el uso del sensor CMOS puede limitar la precisión del ajuste. Asimismo, al observar atentamente la Figura 7.3b), se advierte una aberración lineal remanente que se manifiesta, en este caso, a través de la ligera variación progresiva de los niveles de gris en el fondo de la imagen. La misma puede corregirse mediante un plano de ajuste de tipo: $\sigma = C_\xi\xi + C_\eta\eta$, de pendientes C_ξ y C_η . Para ello, a partir de la imagen de fase se obtienen 4 puntos particulares que permiten calcular las pendientes C_ξ y C_η en las direcciones ξ y η respectivamente. Con este fin, se toman las n primeras filas superiores (n por defecto es 10) y se calcula la mediana M_{sup} de todo el conjunto de datos. La misma operación se lleva a cabo para: las n últimas filas, las n primeras

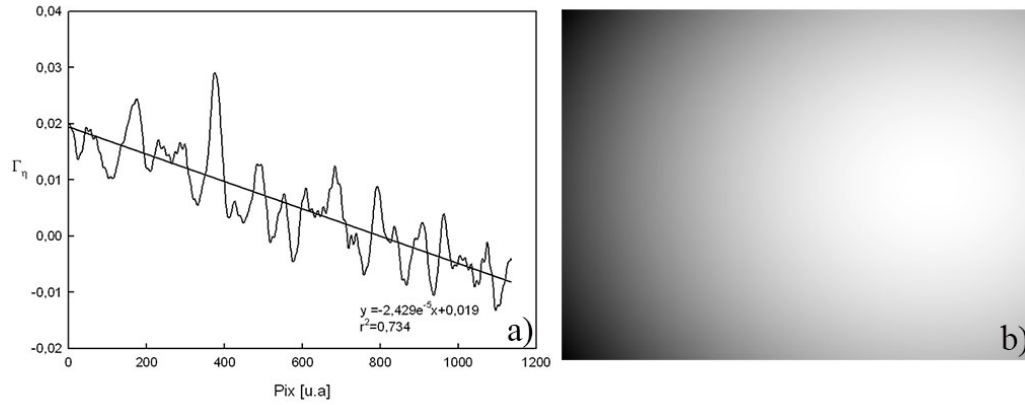


Figura 7.5.: a) Perfil Γ_η obtenido calculando la mediana; b) Paraboloide de corrección

columnas, y las n últimas, obteniéndose M_{inf} , M_{der} y M_{izq} respectivamente. Por último, las pendientes C_ξ y C_η se estiman mediante la siguiente relación:

$$C_\xi = \frac{M_{sup} - M_{inf}}{N - n}$$

$$C_\eta = \frac{M_{der} - M_{izq}}{M - n}$$

siendo $N \times M$ las dimensiones de la matriz. Los resultados de esta operación se ilustran en la Figura 7.6. En la Figura 7.6a) se muestra nuevamente la fase de la Figura 7.3b), en la Figura 7.6b) se muestra la corrección de la aberración lineal remanente, mientras que en la Figura 7.6c) se muestra el plano de ajuste, obtenido con los parámetros calculados con el procedimiento propuesto. A pesar de su simpleza, la metodología arroja buenos resultados y no requiere del procesamiento de gran volumen de datos.

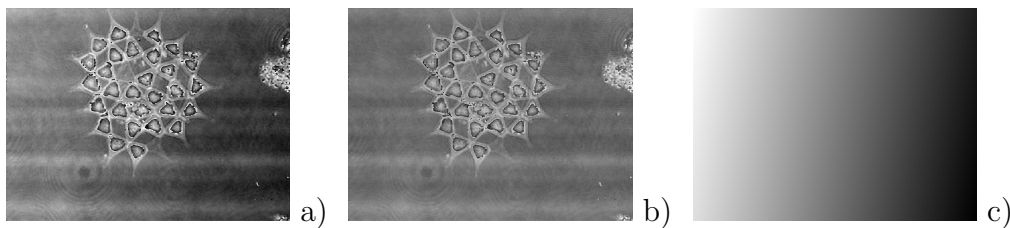


Figura 7.6.: Fase envuelta: a) sin corregir aberración lineal remanente; b) corrigiendo la aberración lineal; c) Plano de ajuste

Cabe destacar que el método propuesto en esta sección para la corrección de la aberración esférica arroja resultados admisibles siempre que en el brazo correspondiente

al haz de referencia se inserte un OM de idénticas características al empleado en el brazo objeto. Como contraparte, si el holograma se registra con un haz de referencia plano la aberración esférica resulta considerablemente mayor, en cuyo caso el método propuesto corrige sólo parcialmente la aberración. Para ilustrar este hecho, en la Figura 7.7a) se muestra la fase envuelta de un holograma registrado con un haz plano, en la que se advierte la gran cantidad de saltos de fase involucrados vinculados a la aberración esférica de la onda objeto. En la Figura 7.7b) se muestra la fase envuelta que resulta al corregir la aberración con el método propuesto, mientras que en la Figura 7.7c) la fase resultante luego de realizar una segunda iteración. Luego, al iterar una tercera vez los resultados no varían (Figura 7.7d)), con lo cual el método arroja su mejor resultado, como máximo, a la segunda iteración.

En este sentido, cabe recordar que los límites del método se encuentran enmarcados dentro de dos hipótesis fuertes: que las variaciones de fase del espécimen sean despreciables en comparación de la aberración y que la lente introduzca aberraciones dentro de la aproximación de Fresnel. Para aberraciones de orden superior, la Ecuación 7.5 deja de ser válida y debe sustituirse por un polinomio que contemple estas posibilidades. Pese a esto, el método es de gran utilidad para nuestros propósitos, pues la configuración usada en nuestros registros incluye la inserción del OM en el haz de referencia, en cuyo caso el método es eficiente y ofrece resultados satisfactorios.

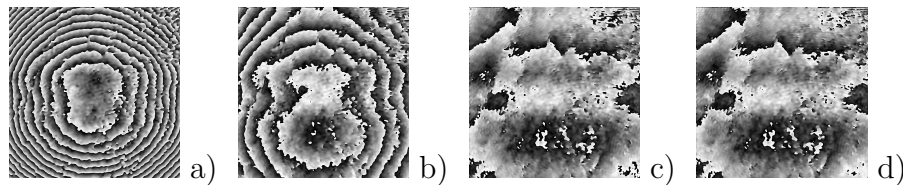


Figura 7.7.: Fase envuelta: a) sin corregir; b) corregida con el método propuesto; c) segunda iteración; d) tercera iteración

7.3. Corrección del efecto *rolling shutter* producido por CMOS

Debido a la naturaleza de lectura secuencial de los sensores CMOS, cada fila del sensor se expone en diferentes tiempos, resultando en el denominado efecto *rolling shutter*, conocido también como efecto persiana, que introduce distorsiones geométricas en la imagen si la cámara o el objeto se mueven durante la adquisición. En particular, para el registro de hologramas digitales y, en general, para la mayor parte de las condiciones experimentales mientras el sensor captura barriendo progresivamente cada fila del holograma, las franjas producto de la interferencia entre el haz objeto y el haz de referencia oscilan debido a vibraciones y/o ruidos externos. El

sensor captura cada fila del holograma en distintas instancias de estas perturbaciones; por ende, los desplazamientos entre las franjas se traducen en aberraciones de fase. Como efecto final se observan patrones de franjas espurias que distorsionan la calidad de los hologramas reconstruidos. En esta tesis se propone un método simple y eficiente para corregir este efecto mediante técnicas de procesamiento digital de imágenes. Se ejemplifica el método con hologramas de especímenes microscópicos estáticos. Los resultados alientan a la incorporación de sensores CMOS por sobre los sensores CCD en los montajes experimentales de Microscopía Holográfica Digital ya que estos ofrecen mejor resolución, además de ser menos costosos en el mercado.

7.3.1. Introducción

En los últimos años, la tecnología CMOS (Complementary Metal Oxide Semiconductor), ha empezado a ganar el mercado de las videocámaras por sobre los tradicionales camcorders que utilizaban sensores CCD (Charge Coupled Device). Ambos tipos de sensores tienen propiedades únicas que hacen a cada uno de ellos adecuado para un tipo de aplicación u otro.

El sensor usado para registrar hologramas debe resolver el patrón de interferencia que resulta de la superposición de la onda de referencia con la onda dispersada de los diferentes puntos del objeto. De acuerdo al teorema de Whittaker-Shannon el muestreo de esta interferencia debe ser al menos el doble de la máxima frecuencia de la señal. El período de muestreo del dispositivo de registro está fijado por el tamaño de los píxeles que conforman el sensor (fotositos), siendo deseable disponer de píxeles elementales más pequeños. Durante las últimas décadas de auge de la holografía digital, los dispositivos CCD han sido los favoritos para reemplazar a los clásicos films holográficos, por su propiedad de satisfacer los requerimientos mínimos de resolución a pesar de su elevado costo [JST01].

Los sensores CMOS cuentan con muchas ventajas en comparación con los sensores CCD. Ofrecen mayor resolución ya que disponen de píxeles elementales más pequeños; requieren de menor energía para su operación, con lo cual generan menor ruido térmico. Además, los primeros registran y descargan las imágenes más rápido siendo más apropiados en cámaras de alta velocidad. Estas propiedades, sumado a su costo más bajo los hacen atractivos como medio de registro en holografía digital.

Sin embargo, la principal diferencia entre ambos sensores subyace en el mecanismo de lectura de la señal. Debido a la estructura de lectura secuencial de los sensores CMOS, cada línea de la imagen adquirida se expone en un instante de tiempo diferente, con un retardo temporal definido por la tecnología del sensor. Si bien este mecanismo de lectura tiene la ventaja de minimizar la memoria buffer, produce el conocido efecto *rolling shutter*, que distorsiona las imágenes tanto si el objeto o la cámara de adquisición se mueven durante la captura.

El problema del efecto *rolling shutter* ha sido objeto de atención en los últimos años, habiéndose desarrollado diferentes técnicas para su atenuación y/o eliminación. Al-

gunas de ellas forman parte de ciertos software de procesamiento de imágenes para aplicaciones de visión automática [LPC, AABA, LCC, CJK08]. En general, se utilizan dispositivos mecánicos o eléctricos o bien se diseñan algoritmos matemáticos que típicamente requieren de varias imágenes de la misma escena para su sincronización. No obstante, en el análisis bibliográfico no se han encontrado reportes relacionados con su corrección en técnicas interferométricas, en las cuales el efecto puede representar un obstáculo mayor.

En las aplicaciones de la MHD, las franjas de interferencia que surgen de la superposición del haz objeto y el haz de referencia son altamente sensibles a ruidos, vibraciones, etc; por lo que pueden cambiar su configuración conforme se realiza el proceso de captura. El resultado de este efecto se traduce en perturbaciones espurias o aberraciones de fase que introducen errores en la información óptica a procesar. Para resolver este inconveniente cuando se utiliza un sensor CMOS como dispositivo de registro, en esta tesis se propone una metodología simple y rápida, basada en procesamiento digital de imágenes aplicada a la información de los mapas de fase continua de objetos biológicos estáticos obtenidos por MHD.

7.3.2. Efecto *rolling shutter*, eliminación y/o corrección

Mientras que todos los fotodiodos de una CCD se exponen a una escena simultáneamente para obtener la señal correspondiente a una imagen, un sensor CMOS accede a cada fila de la imagen secuencialmente. Esquemáticamente, la forma de operación de captura de este tipo de dispositivo se ilustra en la Figura 7.8.

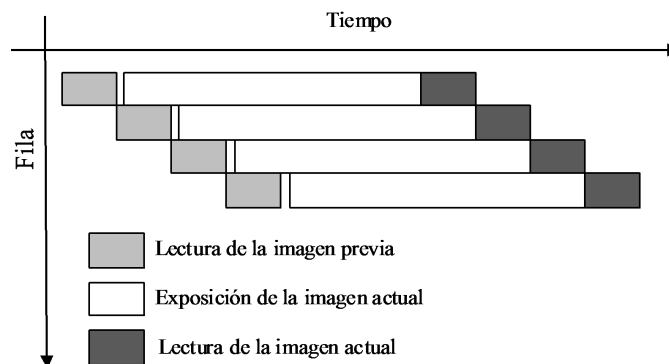


Figura 7.8.: Sincronización de la matriz de sensores CMOS

Los tiempos de lectura de cada fila de la imagen no se superponen, y la lectura sólo comenzará después que la lectura anterior se haya completado. El intervalo de tiempo entre la exposición y la lectura es el tiempo requerido para el restablecimiento del fotosensor. Este efecto normalmente conocido como *rolling shutter* (en adelante RS en el contexto de esta tesis,) produce que el objeto, cuya imagen se desea registrar, pueda aparecer inclinado, cortado, alargado, reducido y aún arbitrariamente deformado.

En el caso de que el objeto que se desea registrar es un holograma, el RS introduce aberraciones de fase. Esto es así ya que, aún en las condiciones experimentales más rigurosas, mientras el sensor registra cada línea, las franjas de interferencia del holograma pueden desplazarse por la presencia de vibraciones y ruidos externos arbitrarios introduciendo «ondulaciones espurias». La evidencia más clara de estas ondulaciones se manifiesta en el mapa de fase continua que se obtiene del holograma. Si bien estas ondulaciones pueden tener una frecuencia característica, muy difícilmente podrán filtrarse en el espectro de Fourier debido a la aleatoriedad del fenómeno.

Para ilustrar la aberración de fase introducida por el efecto rolling shutter, en la Figura 7.9 se muestran para una microalga *Ceratium Hirundinella* inmersa en un medio acuoso tanto el holograma registrado con una longitud de onda de 632.8 nm (Figura 7.9a)), como la correspondiente imagen de amplitud y de fase continua (Figura 7.9b) y c) respectivamente). En la imagen de fase se advierte que el fondo no es uniforme, tal como se esperaría para un medio circundante homogéneo como lo es el agua. Esto da cuenta de la aberración, la cual se pone de manifiesto como un patrón de ondulaciones horizontales.

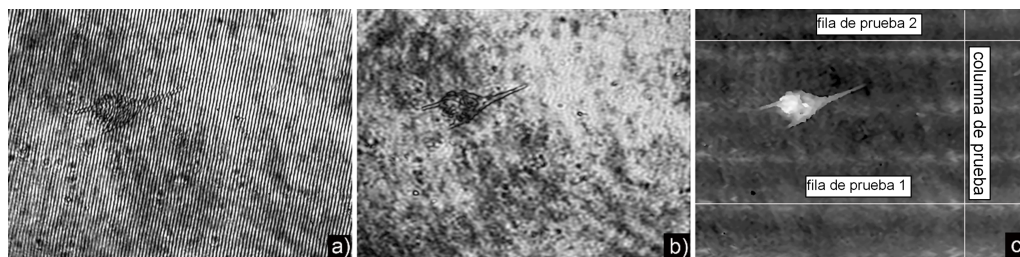


Figura 7.9.: a) holograma de microalga *Ceratium Hirundinella*; b) módulo; c) fase desenvuelta.

Típicamente, en MHD los errores de fase se estiman computando la desviación estándar (DE) en un área que se asume plana dentro del mapa de fase desenvuelto. En nuestro caso, esto se corresponde a cualquier porción perteneciente al fondo de la Figura 7.9c). Sin embargo en nuestro caso, debido al RS, cualquier porción del fondo puede estar alterada por la aberración. Alternativamente, la influencia del ruido de fase introducido por el sensor puede apreciarse cuantitativamente a partir de los valores de fase a lo largo de dos filas de prueba en la dirección horizontal X (fila de prueba 1 y 2 de la Figura 7.9c)) y una columna en la dirección vertical Y, todas pertenecientes al fondo que se asume idealmente de fase constante. Esto se ilustra en la Figura 7.10a), donde se aprecia que ambos perfiles fila (fila de prueba 1 y fila de prueba 2) tienen DE similares, pero con valores de fase promedio que difieren en aproximadamente 2 radianes, evidenciando cuantitativamente el RS. Por otro lado, los valores de fase del fondo se desvían de un valor constante tanto para los perfiles fila (Figura 7.10a)) como para el perfil columna (Figura 7.10b)), aunque dicha desviación es mucho más significativa en la dirección vertical que en la

dirección horizontal (notar la diferencia en escala de los gráficos). Suponemos así, que la DE de los perfiles X pertenecientes al fondo dan una medida del ruido de fase experimental no relacionado con el RS, mientras que la DE de los perfiles Y de la aberración vinculada al RS introducido por el sensor CMOS. Luego de analizar varios perfiles se encuentra un valor promedio de DE de 0.16 para la dirección X y 0.54 para la dirección Y. En términos de longitud de camino óptico, estos valores representan errores de fase promedio de alrededor de 16 nm y 54 nm respectivamente, siendo esta última más de tres veces la primera.

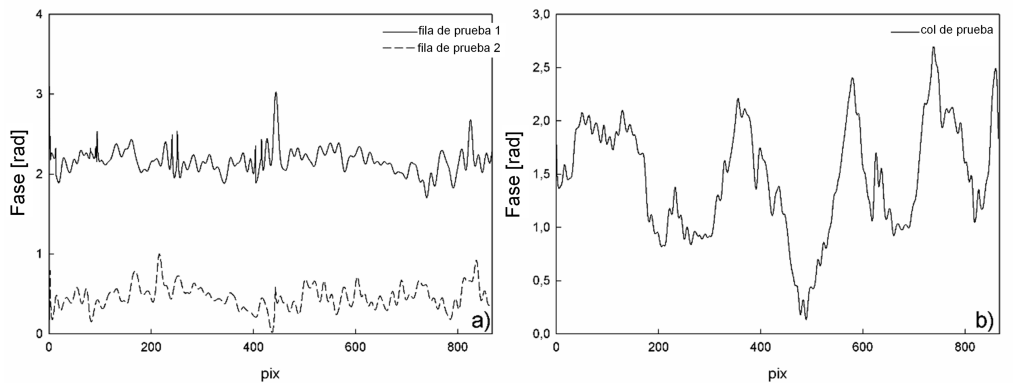


Figura 7.10.: Perfiles de la imagen de fase desenvuelta; a) perfiles en la dirección X b) perfil en la dirección Y

En ausencia del efecto RS, ambas filas de prueba de la Figura 7.10a) tendrían valores de mediana similares. Dado que no lo tienen, la mediana de cualquier fila de prueba podría considerarse como un valor representativo asociado con el RS. Basados en esta idea, la metodología propuesta para compensar la aberración, consiste en aplicar ordenadamente una serie de operaciones matemáticas sobre la matriz de datos de la fase desenvuelta original, matriz de dimensiones $N \times M$, los cuales pueden resumirse en los siguientes pasos:

1. Se calcula la mediana de cada fila (dirección X) y se lo almacena en un arreglo unidimensional $N \times 1$.
2. Al arreglo resultante se le aplica un filtro espacial suave, tal como un filtro Gaussiano, con el fin de suavizar bordes. El tamaño por defecto es 5 píxeles.
3. El arreglo del paso 2 se *estira* a las dimensiones de la matriz original, replicándolo hasta convertirlo en una matriz de $N \times M$. A esta matriz se la denomina *Matriz Filtro*.
4. Finalmente, la Matriz Filtro se sustrae punto a punto del mapa de fase continuo.

Notar que se ha elegido la mediana de cada fila del mapa de fase desenvuelto como valor representativo del efecto RS, y no el valor promedio. Esto se debe a que, por un

lado, la mediana representa un valor de fase real medido experimentalmente, y, por otro, a diferencia del promedio, ésta no se ve afectada por valores extremos, como por ejemplo los valores de fase pertenecientes al espécimen de interés (la microalga en nuestro caso).

7.3.3. Resultados y Discusión

Para nuestros experimentos el sensor utilizado es un CMOS Array Bayer monocromo de 2592×1944 píxeles cuadrados de $1,75\mu\text{m}$ de lado. En el caso que nos ocupa, tanto la cámara como el objeto se encuentran estáticos durante el proceso de adquisición mientras que las franjas de interferencia que constituyen el holograma oscilan o vibran debido a factores externos. Por lo tanto, el RS sólo afecta a la información de la fase y no se pone de manifiesto en las imágenes de amplitud. Debido a que en las aplicaciones interferométricas, como la MHD, la información relevante está codificada en la fase, todas las aberraciones producidas tanto por dispositivos experimentales como por perturbaciones externas deben corregirse previo a relacionarla con la cantidad física que se desea medir. Para nuestros propósitos esta puede ser, por ejemplo, la medida de, biovolumen o del índice de refracción del espécimen bajo estudio.

Aplicando el algoritmo descrito en la Subsección 7.3.2, se construye la matriz filtro de las franjas espurias y se la sustrae punto a punto de la matriz de fase continua original (que se muestra nuevamente en Figura 7.11a)). Como resultado, se obtiene un mapa de fase libre de ondulaciones espurias, tal como se ilustra en la Figura 7.11c). La matriz filtro, convenientemente transformada en escala de grises con fines ilustrativos, se muestra en la Figura 7.11b).



Figura 7.11.: Se muestra en a) fase continua original; b) matriz filtro; c) imagen de fase desenvuelta corregida

Una vez que el efecto RS ha sido corregido, se calcula la DE de un área correspondiente al fondo de la imagen la cual arroja un valor de 0.17. Notar que este valor es muy similar al que se había calculado para las filas de prueba (no vinculado al efecto RS) y está en el orden de los errores de fase típicos de la holografía digital que, al ser una técnica interferométrica, es susceptible a varias fuentes de ruido, tales como vibraciones, ruidos térmicos, ruido de speckle, etc. Por este motivo, puede concluirse que el método propuesto corrige satisfactoriamente la aberración.

Como ejemplo adicional, en la Figura 7.12 se muestran los resultados sobre otros dos hologramas. Se advierte que el efecto RS varía de un holograma a otro, ya que se encuentra ligado a las perturbaciones externas que ocurren durante el tiempo de captura y que no pueden conocerse con antelación. En cualquier caso, el método corrige la aberración con éxito.

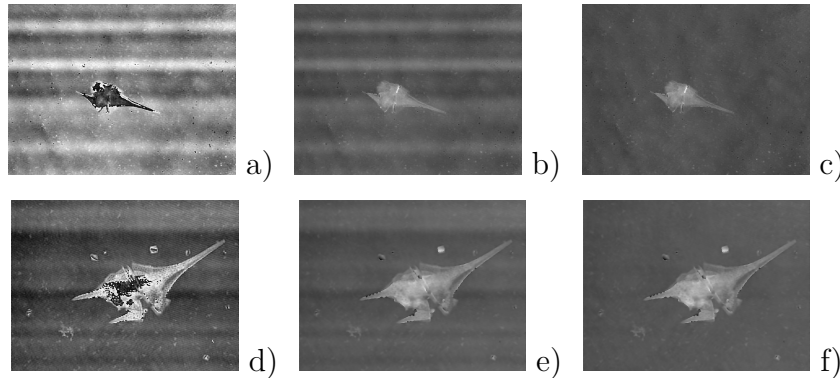


Figura 7.12.: Fase envuelta, fase desen vuelta y fase desen vuelta corregida respectivamente de un holograma: a), b) y c) tomado con un OM de 10X; d), e) y f) tomado con un OM de 20X

Cabe destacar no obstante, que cuando los microorganismos abarcan porciones considerables del campo visual, ya sea porque se utilizan OM de mayor potencia o porque los especímenes son naturalmente de gran tamaño, el algoritmo podría arrojar resultados inexactos. Para estos casos, podría suceder que para algunas filas, se compute un valor de la mediana correspondiente a un valor de fase de un píxel dentro del espécimen, generando una matriz filtro con contribuciones de fase adicionales del espécimen y no meramente de la aberración por RS. En este sentido, los mapas que se muestran en la Figura 7.12d, e y f, corresponden respectivamente a: el mapa de fase módulo 2π , el mapa continuo sin corregir y el mapa continuo corregido de un holograma tomado con un OM de 20X. Entre las ventajas de usar OM de mayor potencia, se encuentra la posibilidad de acceder a información más detallada del espécimen, tal como se observa en la figura. Para este caso, si bien la microalga abarca un área considerable del campo visual, el algoritmo propuesto corrige la aberración sin afectar notablemente las contribuciones de fase del espécimen.

Hasta aquí, el método fue ensayado sobre hologramas registrados con el microscopio holográfico montado sobre una mesa holográfica, tratando de minimizar las perturbaciones externas. Claramente, aún en estas condiciones, esenciales para holografía, el efecto RS se manifiesta en los mapas de fase. Cabe recalcar que el método propuesto es efectivo incluso cuando los hologramas son registrados sin las condiciones estables usualmente requeridas en holografía, en cuyos casos la aberración por RS corrompe de manera sustancial el mapa de fase. Para estimar el error introducido en experimentos bajo condiciones no aisladas, se registran hologramas sin muestra justo después de haber golpeado vigorosamente la mesa holográfica. Se supone que

no existen variaciones en la temperatura del aire mientras dura el registro, por lo que el índice de refracción es constante y, teóricamente, las franjas del holograma registrado en configuración fuera de eje debieran ser rectas paralelas, o bien segmentos de arco de circunferencia bien regulares. Como consecuencia, luego de corregir la aberración por configuración fuera de eje y/o esférica, el mapa de fase continuo (desenvuelto) tendría que ser constante. Por el contrario, las franjas de los hologramas se encuentran notablemente distorsionadas por el RS, como se evidencia en el recuadro de la Figura 7.13a). El mapa de fase desenvuelto sin aplicar la corrección propuesta se muestra en la Figura 7.13b), en el que se aprecian grandes variaciones de fase producto de la aberración. Al aplicar la corrección, la reducción de la aberración se hace evidente en la Figura 7.13c), en la cual, a menos de algunos artefactos, se observa un mapa de fase continuo más o menos uniforme.

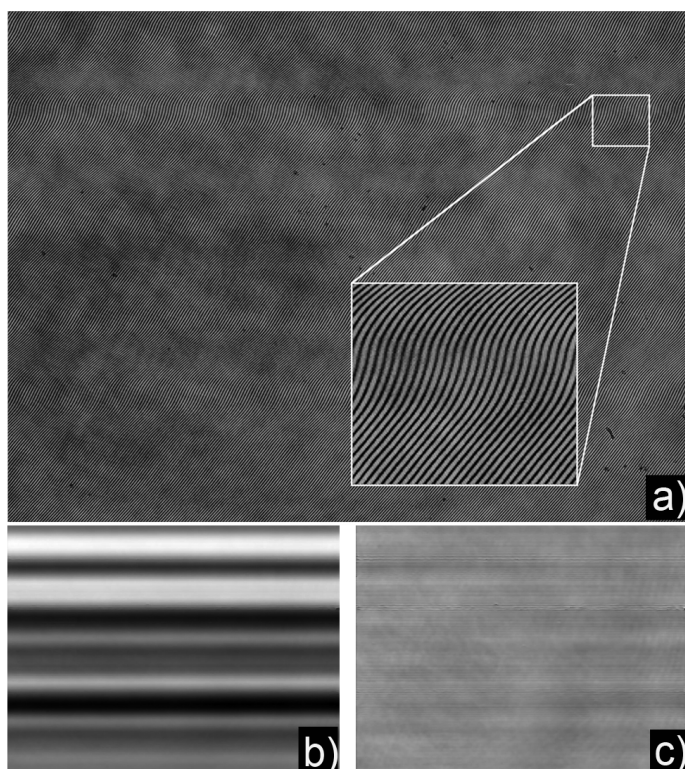


Figura 7.13.: a) holograma luego de golpear la mesa holográfica, b) fase desenvuelta, c) fase desenvuelta corregida

Con el fin de exponer el efecto cuantitativo de la corrección de la aberración sobre los mapas de fase, se extraen varias líneas horizontales y verticales de los mapas de fase de la Figura 7.13b) y c). En la Figura 7.14a) se muestran como ejemplo las variaciones que experimenta la fase en una fila de prueba con y sin la corrección de la aberración; similarmente, en la Figura 7.14b) se muestran las variaciones de fase con y sin corrección para una columna de prueba. Tal como se espera, las variaciones de fase para la fila de prueba corregida y sin corregir son similares, con

una DE de 0.21 y 0.26 respectivamente (equivalentes a longitudes de camino óptico de 21 nm y 26 nm). No obstante, en la dirección vertical las variaciones de fase en la columna de prueba no corregida son mucho más significativas, con una DE de 7.5, evidenciando un nivel de ruido introducido por RS equivalente a una longitud de camino óptico del orden de los 759 nm y múltiples saltos de fase módulo 2π . Como consecuencia, si no se corrige la aberración la información de cualquier objeto bajo estudio se encontrará enmascarada por el efecto RS. Para el caso de objetos microscópicos registrados por MHD, los errores introducidos por efecto RS podrían afectar considerablemente la precisión de las mediciones. Al efectuar la corrección, la DE de la fase para la columna de prueba resulta de 0.26, valor 28 veces menor al obtenido para la columna sin corregir, y consistente con el ruido de fase obtenido para la fila de prueba. Estos resultados muestran que el método propuesto corrige el efecto RS de manera aceptable incluso cuando las condiciones de registro del holograma son desfavorables.

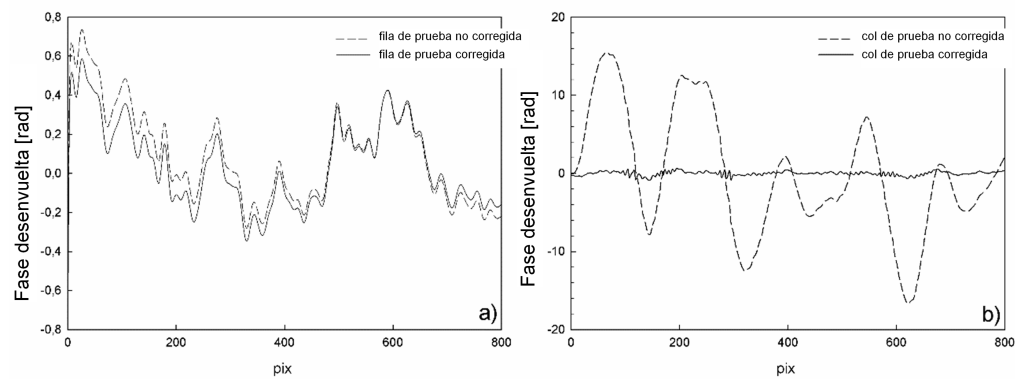


Figura 7.14.: Perfiles extraídos de la imagen de fase desenvuelta de la Figura 7.13b) y c) a) Perfil horizontal; b) Perfil vertical

7.3.4. Conclusiones

Como conclusión, el método resulta simple y eficiente para corregir aberraciones de fase introducidas por el efecto *rolling shutter* característico de los sensores CMOS. La propuesta resulta novedosa ya que en la literatura no se han encontrado reportes para la corrección de este efecto en aplicaciones de interferometría. Los resultados muestran que la aberración puede corregirse con considerable simplicidad, lo que alentaría promover la sustitución de los costosos CCD en MHD. Los resultados de esta investigación han sido publicados en ANALES AFA (Ver Apéndice B). Asimismo, se encuentra en revisión un artículo enviado a Optics Communications.

8. Detección de *Trypanosoma Cruzi* en sangre mediante MHD

Algunos hemoparásitos, tales como la *Filaria* y el *Trypanosoma cruzi* (T. *cruzi*), pueden identificarse en muestras de sangre por su movimiento, el cual es oscilatorio y se propaga a través del medio a regiones alejadas de la muestra. En particular, este comportamiento puede ser aprovechado para caracterizar los movimientos del parásito T. *cruzi*. El presente capítulo está dedicado a la descripción de una propuesta para detectarlo automáticamente en muestras de sangre fresca.

Con este fin, se calibra el microscopio holográfico por transmisión. Los movimientos de los microorganismos se detectan midiendo las alteraciones de fase que producen en el frente de onda transmitido. Para ello, una capa fina de sangre infectada con el parásito se examina en el microscopio holográfico. Se registran dos hologramas consecutivos del mismo campo visual; estos se restan punto a punto, y el resultado se reconstruye mediante el método PEA. La distribución de fase resultante está relacionada con dos instantes de tiempo diferentes, lo que permite detectar la presencia del parásito. Los resultados experimentales alientan a incorporar la técnica como parte de un sistema completamente automatizado para detectar y contar este tipo de microorganismos.

8.1. Introducción

La identificación de microorganismos en sangre con fines taxonómicos o para el diagnóstico de determinadas enfermedades, es una tarea de rutina en muchos laboratorios. Existen varios recursos para la detección, tales como los métodos de cultivo, que tienen la desventaja de dar resultados diferidos, o métodos basados en la Biología Molecular, que demandan un costo demasiado alto en el ámbito de la Salud Pública. Por ello, en los últimos años, diversas investigaciones se han orientado a la búsqueda de nuevas técnicas de detección, alternativas o complementarias, que superen estos inconvenientes y puedan utilizarse como herramientas de diagnóstico [ZPI93, FSC04, DJ07].

Si la evaluamos en términos de Salud Pública e impacto económico, la enfermedad de Chagas-Mazza constituye la más importante infección parasitaria de Latinoamérica [Chi04]. Aproximadamente 10 millones de personas la padecen, con diferentes grados de afectación y 100 millones de personas (25 % de la población de Latinoamérica)

está en riesgo de contraerla. Es causada por el protozoo *Trypanosoma cruzi* (T. *cruzi*), un parásito móvil que ingresa al torrente sanguíneo a través de la piel y afecta a diversos órganos, causando varios grados de discapacidad sobre todo en el tracto digestivo y el corazón. Como la mayoría de los especímenes biológicos, este parásito es transparente, por lo que resulta dificultoso distinguirlo del medio circundante mediante microscopía de campo brillante. Afortunadamente, muchos hemoparásitos pueden detectarse por los movimientos que inducen en los glóbulos rojos adyacentes. Aprovechando esta característica, Alanís *et al.* [ABC⁺92, ARÁ⁺01, ARÁ⁺04] desarrollaron un método para la detección temprana de T. *cruzi* en muestras de sangre. El principio de detección subyacente se basa en la diferenciación temporal de una secuencia de imágenes del mismo campo visual registrado con una cámara de video CCD. El proceso se lleva a cabo mediante diversas herramientas de Procesamiento Digital de Imágenes, que es capaz de detectar la presencia del parásito a tiempo real.

En esta tesis, se propone el uso de la MHD como una herramienta para detectar el parásito en muestras de sangre de ratones infectados con la enfermedad de Chagas. En comparación con los métodos propuestos por Alanís *et al.* se reporta una mejora en la velocidad de detección óptica ya que se requiere de sólo dos hologramas consecutivos. La resta de los hologramas resulta en un nuevo «holograma» que contiene información relacionada con el movimiento de los parásitos durante el tiempo transcurrido entre los registros. La reconstrucción de este último produce patrones característicos en el mapa de fase, a partir del cual es posible detectar la presencia del parásito haciendo uso de operaciones simples de procesamiento digital de imágenes.

8.2. Enfermedad de Chagas

El T. *cruzi* vive en la sangre y tejidos de personas y animales enfermos. Si se lo observa en sangre, presenta una forma alargada, fusiforme, con núcleo voluminoso en su parte central y una cola móvil llamada flagelo (tripamastigote). Cuando se encuentra en el interior de las células tiene una forma redondeada, más pequeña y sin flagelo.

En la cadena de transmisión de la enfermedad de Chagas-Mazza hay un intermediario que es el eslabón obligatorio: el insecto vector. En América se conocen varias especies capaces de transmitir la infección a través de sus defecaciones; en la Argentina, la única de importancia epidemiológica es la denominada *Triatoma Infestans*, conocida popularmente con el nombre de vinchuca o “chinche gaucha”. El insecto se encuentra en gran cantidad en las zonas selváticas, y se infecta al alimentarse con sangre de animales enfermos.

El hombre es un huésped desafortunado en el ciclo de transmisión de la enfermedad, ya que su participación no es vital para la permanencia del parásito en la naturaleza.

Existen tres vías básicas de transmisión mediante las cuales el hombre adquiere la enfermedad:

- *A través de la vinchuca*: es la vía más frecuente (85 % de los casos). Las vinchucas se infectan al chupar sangre de mamíferos o humanos enfermos. Eventualmente el insecto portador, en su diaria búsqueda de alimentos, se alimentará de la sangre de una persona sana, defecando a continuación sobre la superficie de la piel. El hombre se contamina al frotarse la zona de la picadura facilitando la entrada del parásito al organismo. Otras vías de entrada las constituyen las conjuntivas, mucosas, u heridas de la piel.

- *Congénita*: esta vía representa el 6 % del total de los casos. El parásito tiene la capacidad de atravesar la placenta e infectar al feto. La transmisión a través de la leche materna es poco probable, con lo cual no existen razones hasta el momento como para restringir el amamantamiento en casos de infección materna.

- *Parenteral*: representa el 9 % del total de los casos y se refiere a la transmisión a través de transfusiones, accidentes en laboratorios donde se manipula sangre contaminada o a través del transplante de órganos provenientes de donantes infectados.

Una vez en el organismo, el parásito ingresa al torrente sanguíneo en forma de tripamastigote y se dirige hacia los tejidos de algunos órganos (miocardio, tracto digestivo) donde se localiza intracelularmente, se multiplica y muta en diferentes formas para luego ser liberados nuevamente al torrente sanguíneo como tripamastigote y repetir el ciclo durante uno a dos meses, momento en el cual la parasitemia se agota como consecuencia de la producción de anticuerpos. Este período caracteriza la fase aguda de la enfermedad. Luego se presenta una fase intermedia o de latencia, generalmente asintomática, que puede durar varios años. Por último en la fase crónica suelen manifestarse los daños provocados por el parásito en el corazón, aparato digestivo o sistema nervioso.

Para diagnosticar la enfermedad existe una serie de métodos, clasificados como directos o indirectos [LARFR00]. Los primeros diagnostican la enfermedad a partir de la detección directa del parásito y pueden ser sólo utilizados durante la fase aguda que está caracterizada por un nivel de parasitemia relativamente elevado. Por su parte, los métodos indirectos, detectan la presencia de anticuerpos desarrollados por el paciente. Éste último puede ser utilizado tanto en la fase aguda como durante las etapas crónicas de la enfermedad (caracterizada por una parasitemia baja).

Dentro de los primeros se encuentran el xenodiagnóstico, el microhematocrito, el método de la gota fresca, el método de concentración de Strout, y el hemocultivo. El xenodiagnóstico presenta una sensibilidad cercana al 100 % en fase aguda, que cae a un 40 % si se usa en fase crónica; y una especificidad del 100 % (es decir, un resultado positivo certifica el diagnóstico). El microhematocrito presenta una sensibilidad y especificidad similares al xenodiagnóstico. El método de concentración de Strout tiene una sensibilidad del 95 %. El hemocultivo se hace a los 8, 15 y 30 días de la exposición, con un rédito diagnóstico similar al xenodiagnóstico.

El xenodiagnóstico es la prueba diagnóstica más útil y efectiva de la enfermedad. Consiste en criar vinchucas sanas en un laboratorio y luego alimentarlas con la sangre del brazo de algún paciente sospechoso. Las excretas del hemíptero son analizadas con el fin de detectar en ellas la presencia del protozoo flagelado.

En el método diagnóstico de la gota fresca se examina la sangre extraída del paciente mediante un microscopio óptico de campo brillante con el objeto de detectar la presencia del parásito. Usualmente se usan OM de 40X, para dar un aumento lateral de 400X. Este método es útil cuando las concentraciones de parásitos son relativamente altas.

Los métodos indirectos consisten en la realización de un conjunto de pruebas inmunológicas, generalmente serológicas. En este caso es obligatorio contar con, al menos, dos pruebas, de las cuales una debe ser de las de mayor especificidad. En particular se destacan la hemoaglutinación y la inmunofluorescencia (detección de anticuerpos por Ig G que se unen a antígenos específicos del parásito).

Dentro de estos, el más sensible es la inmunofluorescencia indirecta (IFI) (sensibilidad cercana al 100 %). Otros, de alta especificidad, son ELISA (especificidad del 99 %) y la aglutinación directa con y sin 2-mercaptoetanol. La fijación del complemento (Machado Guerreiro) y la hemoaglutinación indirecta (HAI) positivizan tardíamente, presentando una sensibilidad del 36 % en la etapa aguda y 85 % a partir del sexto mes de infección para la fijación del complemento.

La necesidad de realización de dos pruebas serológicas para la confirmación del diagnóstico de la enfermedad, se debe al alto porcentaje de falsos positivos que se dan por reacción cruzada en pacientes infectados por paludismo, leishmaniasis, sífilis y otras enfermedades parasitarias o no. Los ensayos empleados no son suficientemente específicos debido a que las preparaciones de antígenos utilizadas son derivados de extractos de parásitos que contienen epítopes que reaccionan con anticuerpos hacia otras infecciones.

Otras técnicas relacionadas son las empleadas en Biología molecular. Con el uso del ADN recombinante, se emplean segmentos clonados de genes de *T. Cruzi* para producir en las bacterias porciones de proteínas antigénicas; y posteriormente, solas o combinadas, se emplean como antígenos blanco en pruebas serológicas.

La necesidad de combinar al menos dos técnicas diagnósticas trae aparejado un aumento en costos y complejidad de estudio. Por ello, en los últimos años, diversas investigaciones se han orientado a la búsqueda de nuevas técnicas diagnósticas para la detección de la enfermedad.

A mediados de la década del 90, en la Universidad Nacional de Salta, el Instituto de Patología Experimental (IPE) junto con el Grupo de Óptica Láser (GOL) de la Facultad de Ciencias Exactas, iniciaron investigaciones en este campo, empleando técnicas ópticas relacionadas con la actividad del speckle láser [ABC⁺92]. La continua búsqueda de métodos más satisfactorios dio lugar, en el año 2001 [ARÁ⁺01], al desarrollo de un prototipo de sistema de conteo automático, que sería de utilidad en

los laboratorios de investigación (se construyó un prototipo financiado por el PFIP, RES. S.C.T.I.P N°026/07). Hacia 2004, y relacionado con el presente trabajo, se desarrolló un método para la detección precoz de parásitos en sangre consistente en un microscopio interferométrico de barrido automático [ARÁ⁺04]. La detección se basa en la decorrelación que causa en imágenes sucesivas la movilidad del parásito. En términos generales, se registran 8 hologramas-imagen de una muestra de sangre infectada; luego, los mismos se restan de a pares y las diferencias se suman para obtener una imagen intermedia donde pueden observarse regiones cuyos valores de niveles de gris son mayores que el resto del campo. Éstas son las áreas relacionadas con las regiones móviles de la muestra. A la imagen intermedia se le realizan una serie de operaciones de procesamiento a fin de poder resaltar las regiones donde se encuentra el parásito (aplicación de filtro de convolución, binarización, etc.). La imagen final es utilizada para confirmar la presencia de un parásito mediante un programa especialmente diseñado para este fin. En este método los hologramas no se reconstruyen, con lo cual la información completa no se decodifica.

La propuesta de este capítulo está basada en la combinación de estas ideas con la posibilidad del acceso a la información de fase que provee la MHD.

8.3. Materiales y métodos

El *T. cruzi* es un organismo visible al microscopio que presenta una movilidad notable frente a los glóbulos rojos circundantes, a pesar de lo cual su detección óptica resulta difícil dada la baja concentración del parásito en los preparados y su bajo contraste óptico. A su vez, estas características lo hacen potencialmente útil para ser detectado mediante MHD. Por un lado, su bajo contraste en amplitud no constituye un problema puesto que, en todo caso, el mapa de fase obtenido de un holograma es portador de la información de mayor relevancia. Además, la frecuencia con la que se mueve el parásito etiológico permite su detección de una manera simple y versátil. Por último, bajas o moderadas parasitemias hacen al método aún más sensible.

El parásito, con su movimiento, empuja notablemente los glóbulos rojos adyacentes, mientras que los glóbulos más alejados no se ven afectados. Si se comparan dos imágenes sucesivas de contraste de amplitud, los glóbulos rojos vecinos estarán ligeramente desplazados mientras que el resto permanecerá más o menos en su lugar. Al restar las dos imágenes, esto se traduce en niveles de gris marcadamente diferentes en las zonas prevalentes del parásito, frente a un fondo comparativamente similar. Asimismo, el movimiento oscilatorio puede interpretarse como una onda que se propaga en el fluido sanguíneo. Un frente de onda particular (que caracteriza una superficie de fase constante) se propagará una cierta distancia en el intervalo de tiempo existente entre un holograma y el siguiente. Por lo tanto, con esto debiera poder registrarse algún cambio en los mapas de fase correspondientes.

8.3.1. Preparación de la muestra

Se prepara una muestra de sangre fresca al extraer sangre de ratones infectados con *T. cruzi*. El protocolo consiste en seccionar 1mm de la punta de la cola del ratón bajo anestesia con éter, y coleccionar y heparinizar 10 μ l de la sangre en un tubo capilar. La sangre se ubica en un portaobjeto y se cubre con un cubreobjetos de $20 \times 20 \text{ mm}^2$.

8.3.2. Registro y reconstrucción de los Hogramas

Se usa la configuración de MHD por transmisión descrita en Capítulo 4; las muestras son iluminadas con un láser de He-Ne de longitud de onda $\lambda = 632,8 \text{ nm}$, y los hogramas registrados en una cámara de video con un sensor CCD de $756 \times 542 \text{ pix}^2$, pixeles cuadrados de $8.4 \mu\text{m}$, 8 bits de profundidad y velocidad de cuadro de hasta 25 Hz. Las imágenes (hogramas digitales) se recortan a un tamaño de $512 \times 512 \text{ px}^2$ y se almacenan temporalmente en el buffer de una tarjeta digitalizadora de imagen. La reconstrucción de los hogramas se realiza por el método de Propagación del Espectro Angular.

8.4. Resultados y Discusión

La muestra de sangre se ubica en la platina de microscopio comandada por dos motores paso a paso que escanean ordenadamente los campos hasta cubrir el área completa de la muestra. Como se mencionó previamente, el método de detección se basa en los movimientos del parásito. Para detectar su presencia, se toman dos hogramas consecutivos del mismo campo y luego se restan punto a punto. A modo de ejemplo, uno de los hogramas registrados se muestran en Figura 8.1a. El hograma diferencia, obtenido por sustracción de este hograma con otro registrado con 400 ms de retardo se muestra en Figura 8.1b.

En esta figura, la curvatura de las franjas de interferencia resalta la presencia de tres parásitos. No obstante, su compleja estructura constituye un considerable obstáculo para cualquier mecanismo de detección asistida por ordenador. Este inconveniente se salva al analizar la información que contiene la imagen de contraste de fase reconstruida, como se explica a continuación.

El proceso de reconstrucción holográfica se ilustra en la Figura 8.2. El espectro angular del hograma diferencia de la Figura 8.1b se muestra en Figura 8.2a donde se aprecian los tres órdenes de difracción típicos de la holografía. Para seleccionar el orden real, se aplica un filtro, como se muestra en Figura 8.2b. El espectro filtrado se centra al origen coordenado del dominio de frecuencias, y se propaga el espectro hasta que el frente de onda es reconstruido a una distancia de $z = 11 \text{ cm}$. Finalmente, se calcula la fase; el mapa de fase módulo 2π se muestra en la Figura 8.2c.

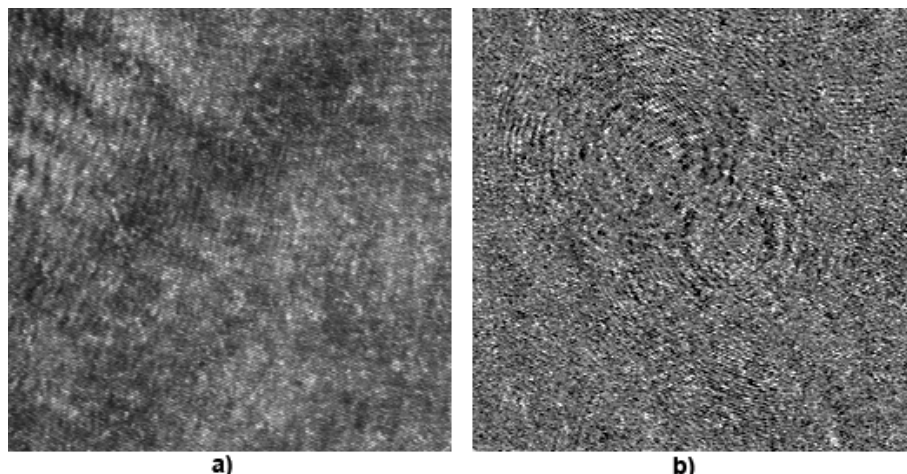


Figura 8.1.: a) Holograma de un campo visual de microscopio, b) Holograma diferencia

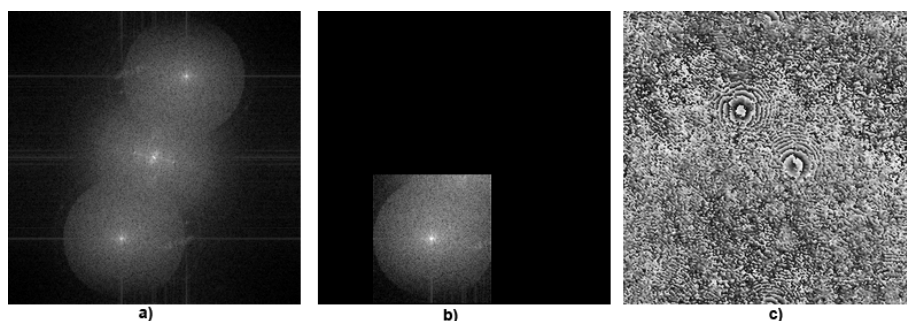


Figura 8.2.: a) Espectro Angular en $z=0$, b) Máscara filtro, c) Fase envuelta

Como se aprecia, la imagen Figura 8.2c ilustra los cambios de fase acontecidos durante ambos registros y exhibe además notables peculiaridades en aquellas regiones en las que los parásitos se mueven durante el tiempo de registro. Las trazas características son ocasionadas por el desplazamiento de los glóbulos rojos que generan las oscilaciones del flagelo del *T. cruzi*. El fondo también sufre de variaciones de fase, ocasionadas por el movimiento propio de los glóbulos rojos, ya que éstos vibran alrededor de su posición original.

Con el fin de obtener una imagen más adecuada que represente los cambios de fase que ocasionan los movimientos del parásito, es necesario desenvolver los mapas de fase. La fase desenvuelta, convertida convenientemente en niveles de gris, se muestra en la Figura 8.3a. En esta imagen, se observan tres regiones bien definidas que destacan los cambios de fase introducidos por los movimientos de *T. cruzi*. Estos cambios de fase son mucho más grandes que los producidos por los movimientos propios de los glóbulos rojos, tal como se observa en la perspectiva 3D de la fase desenvuelta en la Figura 8.3b.

El método para detectar y contar automáticamente el número de parásitos, se basa

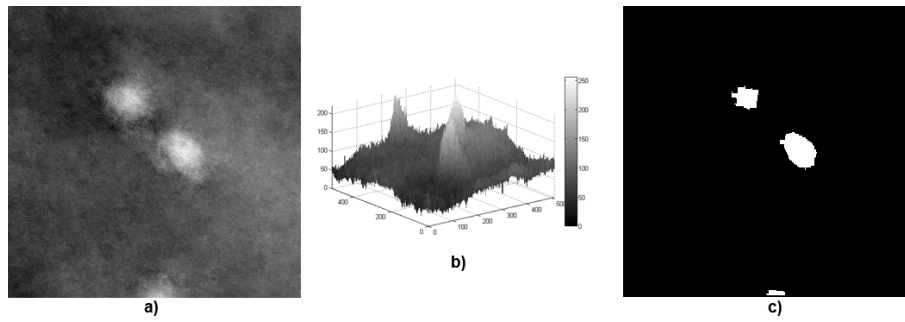


Figura 8.3.: Fase desenvuelta, a) Imagen 2D, b) perspectiva 3D, c) imagen 2D binarizada

en la detección de picos en los mapas de fase desenvuelta. El criterio de discriminación incluye un proceso de binarización de imagen, usando un umbral adecuado (Figura 8.3c), y la aplicación de las operaciones morfológicas «erosion» y «bwlabel» para el conteo, ambas incluidas en la librería de herramientas de procesamiento de imágenes de MATLAB. El proceso se repite para cada campo visual hasta que se examina por completo la muestra.

La precisión de la metodología de detección automática se encuentra condicionada a la extensión espacial de las trazas que denotan la presencia del parásito en los mapas de fase 2D. El tamaño de la superficie de las peculiaridades de fase depende fuertemente de la distancia de reconstrucción z y también del retardo temporal entre el registro de los hologramas. Para evitar falsos positivos, se realizaron varios experimentos para determinar los valores adecuados para estos parámetros. La dependencia del tamaño del área de las trazas con la distancia de reconstrucción se muestra en la Figura 8.4. Cuando la distancia de reconstrucción coincide con la distancia de enfoque (Figura 8.4a), las perturbaciones de fase debidas al movimiento del parásito se encuentran eclipsadas por el movimiento de los glóbulos rojos. Por lo tanto, la reconstrucción numérica se lleva a cabo fuera de foco, como se muestra en la Figura 8.4b, c y d respectivamente.

Estos resultados indican que las áreas de las trazas en la fase deberían convenientemente ser lo suficientemente grandes para distinguirlas del entorno, pero lo suficientemente pequeñas para evitar la superposición de trazas de dos parásitos diferentes. Experimentalmente, se encontró que la distancia de reconstrucción $z = 11$ cm resulta óptima para asegurar la detección. Del mismo modo, para esta distancia de reconstrucción se reconstruyeron 30 hologramas-diferencia del mismo campo visual con diferente retardo temporal entre los hologramas consecutivos. Los resultados sugieren que para un retardo temporal mayor a 400 ms, las áreas de las trazas satisfacen las condiciones arriba mencionadas.

Como última consideración, cabe señalar que en esta aplicación no se requiere formación de imagen de los microorganismos, lo que realza la efectividad y simplicidad de la técnica propuesta para la detección de *T. cruzi* en muestras de sangre.

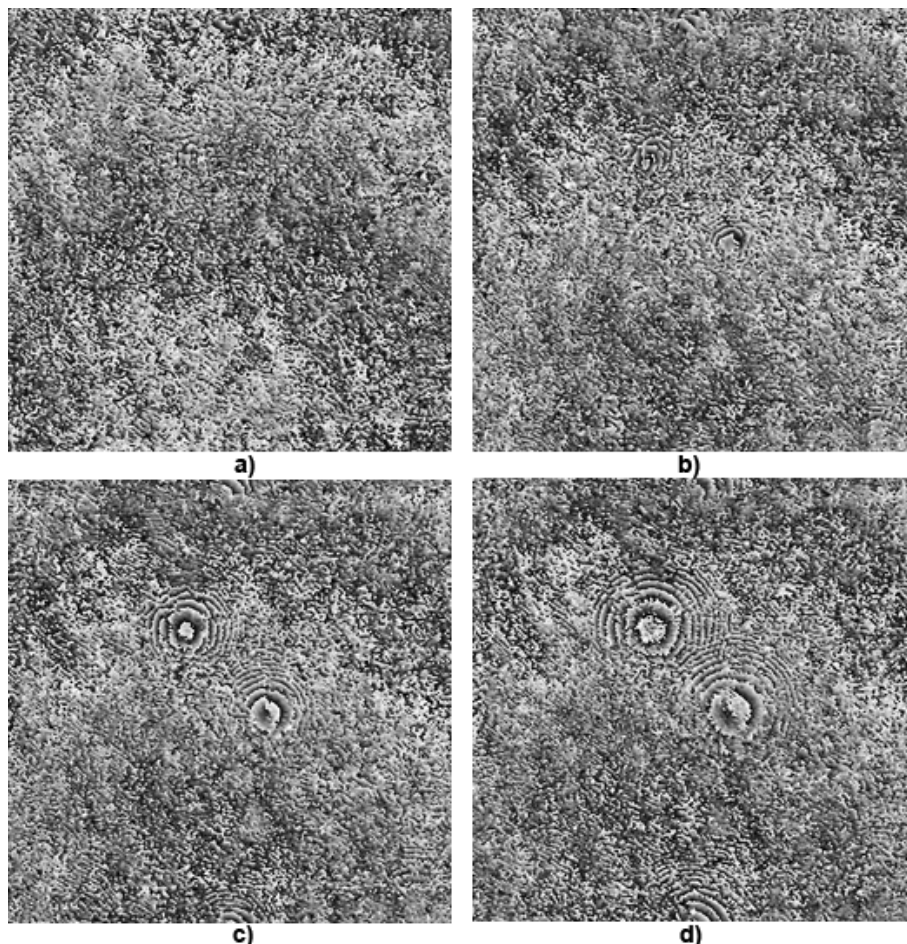


Figura 8.4.: Fase reconstruida a a) $z = d = 14$ cm; b) $z = 13$ cm; c) $z = 9$ cm; d) $z = 11$ cm

8.5. Conclusiones

La MHD se propone como una técnica alternativa para la detección de *T. cruzi* en muestras de sangre fresca. Los resultados sugieren que el método podría automatizarse para ser utilizada en el futuro, como soporte complementario de las técnicas que se aplican actualmente para el diagnóstico temprano de la enfermedad de Chagas. Los métodos automáticos representan una nueva tendencia para llevar adelante mediciones más precisas de la presencia y cantidad de microorganismos en su ambiente natural, eliminando la parcialidad del observador, al reducir los errores inducidos por fatiga y reduciendo apreciablemente el tiempo de análisis de la muestra. El método permite explorar el 100% de la muestra, ya que los campos de visión son rectangulares y no circulares como en el método clásico de observación bajo microscopio convencional. El hecho de que la MHD permite el cálculo del campo óptico a cualquier distancia del plano del holograma, constituye una ventaja adicional puesto que se pueden obtener imágenes desenfocadas numéricamente, sin

intervenir mecánicamente en la configuración óptica.

Los resultados de estas investigaciones han sido publicados en Optics Communications (Ver Apéndice B).

9. MHD aplicada a la evaluación de biovolumen microalgal

La abundancia relativa de biomasa en un cuerpo de agua es uno de los indicadores más comúnmente utilizados en los estudios de calidad de aguas. Su cómputo involucra tareas complejas que van desde la identificación y caracterización de microorganismos a la medida de su biovolumen. Particularmente, este último se estima asociando cada género de fitoplancton con formas geométricas simples, de modo que el cálculo se lleve a cabo midiendo dimensiones lineales en imágenes al ser observados en microscopios convencionales.

Con el objetivo de contar con un método más preciso y automático para la evaluación del biovolumen, en este capítulo se propone una metodología híbrida basada en MHD y herramientas de Procesamiento Digital de Imágenes (PDI). Para ello, el volumen del espécimen bajo estudio se obtiene combinando la imagen de contraste de fase de un holograma del mismo, con un perfil de espesores extraído a partir de su silueta.

La técnica ha sido implementada para determinar el biovolumen de microalgas de la especie *Ceratium hirundinella* en muestras de agua. Adicionalmente, se ha encontrado que a partir de la metodología propuesta es posible estimar con precisión un *índice de refracción efectivo* del microorganismo. Los resultados experimentales muestran que esta técnica no sólo es una alternativa rápida y eficiente en comparación de los métodos clásicos, sino que también resulta adecuada para automatizar el proceso completo.

El capítulo se inicia con una descripción de la problemática regional que ha inspirado la propuesta de brindar una herramienta alternativa y/o complementaria en los trabajos de rutina que se realizan para la evaluación de calidad de aguas. Luego, se describen los métodos que se adoptan usualmente en este tipo de estudios. A continuación se enfatiza brevemente la importancia de la especie seleccionada. Entonces se presenta la técnica propuesta, realizando un análisis crítico de las condiciones de validez de las hipótesis presentadas. Por último, se muestran los resultados y se compara con los que se obtienen por el método clásico.

9.1. Introducción

9.1.1. Problemática regional

Las características geográficas y climáticas de la provincia de Salta, determinan que la disponibilidad del recurso hídrico tenga diversas restricciones no sólo en su cantidad sino también en su calidad. Existen numerosos antecedentes que indican la presencia de diversos compuestos químicos considerados nocivos para la biota (boro, nitrato, mercurio, entre otras) en el agua superficial y/o subterránea por sobre el límite establecido por la reglamentación vigente (SHR 1998, Ley Residuos Peligrosos, CAA 2000). En los ríos ARIAS-ARENALES, ROSARIO, MEDINA, JURAMENTO y en los embalses CABRA CORRAL y EL TUNAL, se han registrado niveles apreciables de contaminantes que condicionan la aparición de floraciones algales recurrentes, instaladas desde fines de 2000 y que continúan a la fecha, produciendo pérdidas de especies ictícolas de interés deportivo y comercial, disminución de la biomasa total, mortandad periódica, etc. Estos problemas traen aparejadas una serie de consecuencias de gran impacto regional, tales como:

- Consecuencias económicas, que involucran la pérdida de sustentabilidad de los múltiples usos del recurso hídrico, las restricciones para su empleo en industrias, y la propagación de enfermedades de interés sanitario.
- Consecuencias ecológicas, tales como la modificación de la estructura de los ecosistemas acuáticos, pérdida de productividad en especial en lo atinente a la pesca de especies de valor comercial, recreación, turismo, etc.
- Consecuencias sociales, debido principalmente a la alteración permanente de hábitats que dejan de ser propicios para los asentamientos humanos, por el deterioro de los recursos hídricos y la pérdida de rentabilidad de los procesos de tratamiento para potabilización.

Las microalgas son las componentes base de la trama alimentaria que soporta la producción ictícola de dichos cuerpos de agua, por lo que se precisa del monitoreo continuo de estos microorganismos y de enormes esfuerzos concentrados en el recuento de individuos de las diferentes especies y del análisis de elevado número de muestras. Dado que muchas veces la morfología de estos microorganismos es compleja, tales tareas demandan una excesiva cantidad de tiempo que frecuentemente supera el tiempo real de respuesta requerido por los organismos involucrados en la toma de decisiones ambientales.

Dentro de los estudios que se llevan a cabo, el biovolumen microalgal constituye uno de los descriptores morfométricos más comúnmente estudiado. Este resulta de gran relevancia en los estudios ecológicos sobre fitoplancton y sirve principalmente para evaluar abundancia relativa (como biomasa o carbono). Parámetros relacionados, tales como tamaño de partículas, contenido de carbono y funciones fisiológicas también forman parte de los estudios en ecosistemas no sólo de agua dulce, sino también

marinos. Por citar un ejemplo, los datos de conversión de volumen celular a unidades de carbono sirven para estimar *in situ* tasas de crecimiento de las asociaciones de algas, o como medida de productividad primaria del sistema.

Existen diversos métodos para la estimación de biovolumen, los cuales fueron mencionados en la Introducción General (Capítulo 1). El más utilizado consiste en asociar las especies de microalgas con formas geométricas más o menos simples y determinar su volumen a partir de medidas lineales accesibles cuando éstas se observan bajo un microscopio ordinario [HRK⁺99, SL03, VCB07, KS11]. En síntesis, el procedimiento consiste en medir al menos veinte biovolúmenes individuales, para cada una de las especies. Luego, se calcula el biovolumen promedio y al resultado se lo multiplica por la cantidad de células/ml de cada especie para obtener la abundancia relativa.

A pesar de los esfuerzos realizados por la comunidad científica, aún no se cuenta con un conjunto estandarizado de ecuaciones para estos cálculos, en los que se incluya a la gran variedad de formas que presentan las microalgas. Generalmente surge el dilema de cuán conveniente resulta asignar una forma fitoplanctónica a un modelo geométrico similar y complejo, o a un modelo simple, fácilmente medible, pero que no responde a la forma del organismo. Idealmente, se busca que las formas geométricas usadas para la determinación de biovolumen sean lo más parecidas posibles a la forma real del organismo, pero al mismo tiempo, fácilmente distinguibles y medibles durante los análisis de rutina. Por ende, esta metodología, además de su complejidad, sólo contribuye con valores aproximados y genera datos que no son comparables.

En este contexto, la MHD surge como una herramienta valiosa por los motivos discutidos exhaustivamente en los capítulos anteriores. Particularmente, problemas típicos de la microscopia convencional como lo son los asociados al enfoque y al bajo contraste óptico desaparecen, pero la característica que le confiere mayor envergadura es la posibilidad de extraer la información *morfológica* del espécimen. Esto es así porque la señal de fase que se obtiene en una configuración por transmisión es proporcional a la Longitud de Camino Óptico (LCO), integrado a lo largo del eje óptico, a través del espécimen el que depende tanto de su morfología como del índice de refracción intracelular. Lamentablemente, la extracción de la información morfológica no es directa, ya que se encuentra acoplada a la información del índice de refracción. Se ha reportado un método para desacoplar ambas variables [RMC⁺05], en el cual la medida del índice de refracción permanece como un valor integral. Recientemente, la holografía tomográfica mediante múltiples ángulos y la microscopía tomográfica de fase han evolucionado para recuperar completamente el mapa de índices de refracción 3D de la estructura intracelular, o para estimar la morfología tridimensional y la forma de microestructuras de manera independiente. A pesar de esto, dichas técnicas precisan de procedimientos de escaneo mecánico, con dispositivos costosos ya sea rotando el objeto [CMM⁺06, CPC⁺06, MMM⁺13], o variando el ángulo de iluminación [VL98], o bien involucran el uso de un láser sintonizable continuo [Kim00, YK05].

En esta tesis, se propone una metodología simple para calcular biovolumen combinando la información que se obtiene de sólo dos hologramas con herramientas de PDI. La técnica se aplica a la determinación de biovolumen de la especie fitoplanctónica *Ceratium hirundinella*.

9.1.2. *Ceratium hirundinella*

Ceratium hirundinella es un dinoflagelado dulciacuícola planctónico de gran tamaño y silueta particular, característico de ambientes meso-eutróficos. Es habitual en las aguas cálidas estratificadas en cuerpos de agua templados en el verano del hemisferio norte. A partir de 1990, esta especie comenzó a dispersarse en Argentina y Chile en los lagos patagónicos y luego rápidamente hacia cuerpos de agua del centro y Norte del país, en particular Salta [MDCC05, Bol05, SMS⁺09, ZBCRR14]. Su rápido crecimiento poblacional, reportado en distintas estaciones desde 2000, ha producido el deterioro de la calidad del agua para consumo, la mortandad masiva de peces y el desequilibrio funcional del ecosistema.

Las floraciones recurrentes de esta especie, fenómeno regional sin antecedentes en el mundo, han determinado que el interés en su estudio creciera notablemente. Una floración o “bloom algal” es el crecimiento excesivo de microalgas, generalmente de una sola especie que encuentra ventajas competitivas sobre otras y se desarrolla hasta alcanzar densidades de 10^5 y 2×10^5 células/ml y una coloración observable en el agua. Indirectamente, una estimación de biomasa puede efectuarse a través de la medición de clorofila *a*. Valores críticos de este pigmento se consideran alrededor de 10 µg/l. Particularmente, en el caso de *Ceratium hirundinella*, se ha observado que incluso con escasa presencia del microorganismo (300 mil células/l) el agua puede presentar una coloración amarronada. Esto se debe a que la contribución de este organismo por unidad a la biomasa algal total es alta debido a su gran tamaño, por lo que una abundancia de 200 mil células/l alcanzan para superar holgadamente los 10 µg/l de clorofila *a*.

Teniendo en cuenta estas consideraciones, el conocimiento de la dinámica de esta especie en los distintos embalses resulta de gran interés ecológico, lo que precisa de estudios exhaustivos en toda la columna de agua a lo largo de todas las estaciones del año y en diversos embalses. En este sentido, no sólo es esencial contar con datos estadísticos descriptivos de las densidades de las poblaciones (microorganismos/ml), sino también prestar especial atención a la estimación de descriptores como el biovolumen y la biomasa [HRK⁺99].

En términos generales, *C. hirundinella* son microorganismos que tienen entre 80 y 400 µm de longitud y se caracterizan por presentar una fuerte compresión dorsoventral; cuentan con un cuerno apical largo, despuntado y estrecho y dos o tres cuernos filosos antapicales que divergen uno del otro distalmente. Presentan además una excavación en el lado ventral, lo que le otorga una complejidad geométrica adicional. Su forma bastante variable determina que el cálculo de su biovolumen por

aproximaciones geométricas se torne engorroso, ya que deben utilizarse complicadas ecuaciones que demandan de varias medidas de longitudes y diámetros por unidad [VCB07].

El presente estudio se lleva a cabo en muestras de agua que contienen *C. hirundinella* colectadas del dique LA CIÉNAGA, provincia de Jujuy, Argentina. Las propiedades descritas en el párrafo anterior se evidencian en la Figura 9.1 que corresponde a la fotografía de un campo de microscopio convencional tomada con un Objetivo de Microscopio (OM) de 10X. Claramente, se observa un cierto grado de uniformidad en la distribución de tamaños, advirtiéndose que la mayor parte de las *C. hirundinella* en la muestra descansan en posición frontal, mientras que sólo algunas en posición dorsoventral, tal como se muestra en la zona resaltada de la misma figura. Aprovechando este hecho, en conjunto con la distribución más o menos uniforme de tamaños, el cálculo del biovolumen se lleva a cabo usando un holograma del espécimen en cada una de estas posiciones. De los hologramas de la microalga en posición frontal, se obtiene el retardo de fase introducido por la misma. Esta información, se combina con un espesor promedio del microorganismo que se calcula a partir de la silueta, extraída de los hologramas, de los especímenes que aparecen en posición dorsoventral, mediante las técnicas de extracción de ROI explicadas en la Sección 6.5.

El cálculo en este caso no requiere de ningún dispositivo sofisticado ni costoso, como los mencionados en la sección anterior. Esto alienta a que, en un futuro mediano, pueda construirse un dispositivo portátil que pueda utilizarse por especialistas para llevar a cabo medidas de biovolumen *in situ* y que cuente con el sistema automatizado aquí desarrollado para la determinación de la abundancia relativa de microorganismos en muestras de agua.

9.2. Materiales y Métodos

9.2.1. Registro de los hologramas y reconstrucción

Se usa la configuración de MHD por transmisión descrita en el Capítulo 4; las muestras son iluminadas con un láser de He-Ne de longitud de onda $\lambda = 632,8$ nm, y los hologramas registrados en una cámara de video con un sensor CMOS Bayer Array de 2592×1944 pix², con píxeles cuadrados de $1.75 \mu\text{m}$, 8 bits de profundidad y velocidad de cuadro de hasta 25 Hz. La reconstrucción de los hologramas se realiza por el método de Propagación del Espectro Angular (PEA) y se aplican los algoritmos de procesamiento de los hologramas y de corrección de aberraciones desarrollados y explicados en los capítulos anteriores. A modo de ejemplo, en la Figura 9.2a se muestra un holograma de la especie, mientras que el frente de onda reconstruido, tanto en amplitud como en fase se muestran en la Figura 9.2b y c respectivamente. La última es la distribución bidimensional de fase módulo 2π . Para acceder a



Figura 9.1.: Un campo típico de una muestra de agua que contiene *C. Hirundinella*, tomada con un microscopio convencional

la medida física subyacente, la fase continua se recupera aplicando el algoritmo de desenvolvimiento mediante mapas de calidad descrito en la Subsección 5.3.2, cuyo resultado y su perspectiva 3D se muestran en la Figura 9.2d y e.

9.2.2. Estimación de biovolumen

La determinación del biovolumen se lleva a cabo a partir de los mapas de fase continua de las microalgas. Considerando la Figura 9.2d, para un píxel arbitrario (i, j) dentro del alga, el retardo total de fase experimentado por la luz a través de la muestra en la dirección z (perpendicular al plano del holograma) está dado por:

$$\phi(i, j) = \frac{2\pi}{\lambda} [n(i, j)h(i, j) + n_0 (D - h(i, j)) + n_g t] \quad (9.1)$$

donde $n(i, j) = \frac{1}{h(i, j)} \int_0^{h(i, j)} n_{c,ij}(z) dz$ es el valor integral del índice de refracción intracelular $n_{c,ij}$ a lo largo del espesor del espécimen $h(i, j)$; n_0 es el índice de refracción constante del medio circundante; n_g es el índice de refracción constante del vidrio; t el espesor del porta y el cubreobjetos en conjunto; y D la altura total de la muestra.

Suponiendo que tanto los índices de refracción del medio circundante como los del del porta y el cubreobjetos son aproximadamente constantes, las contribuciones que

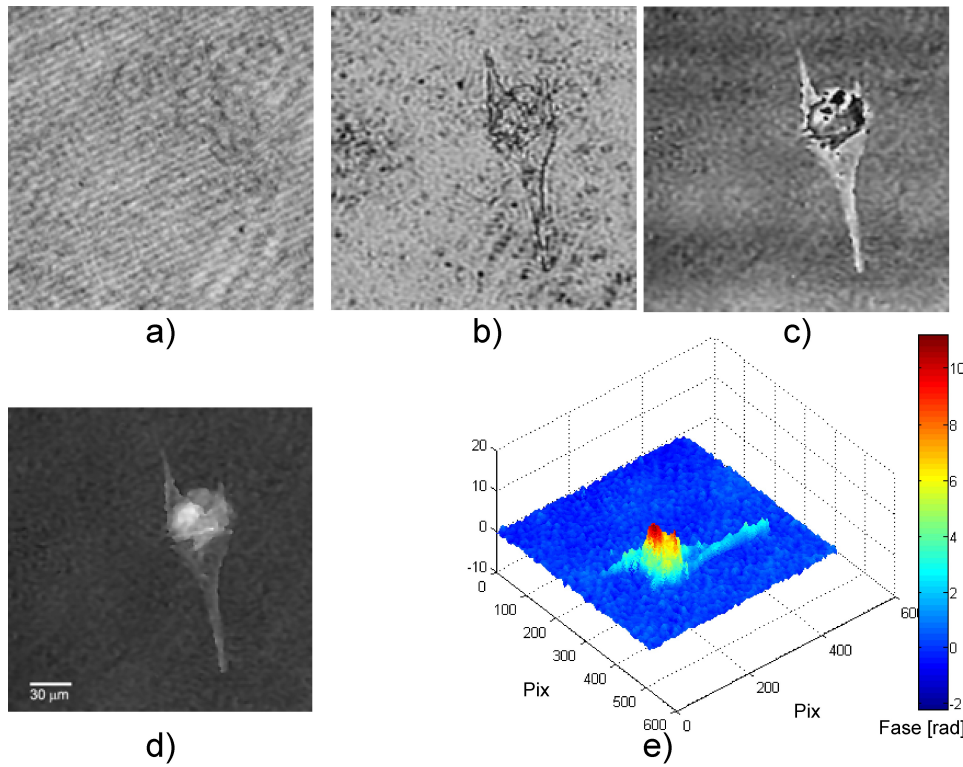


Figura 9.2.: a) Holograma de una *C. hirundinella*, b) amplitud, c) fase módulo 2π , d) fase desenvuelta, y e) representación 3D de d).

introducen a la señal de fase pueden evitarse fácilmente sustrayendo el valor de la mediana de la señal de fase dada por Ecuación 9.1. Re-acomodando la Ecuación 9.1, es fácil mostrar que para cada píxel (i, j) la componente de la señal de fase que corresponde netamente al retardo introducido por el espécimen es:

$$\phi(i, j) = \frac{2\pi}{\lambda} (n(i, j) - n_0) h(i, j) = \frac{2\pi}{\lambda} \Delta n(i, j) h(i, j) \quad (9.2)$$

Esta ecuación muestra que el retardo de fase introducido por el microorganismo en cada punto, depende tanto del espesor del mismo (requerido para el cálculo del biovolumen), como de la diferencia entre el índice de refracción intracelular y el índice de refracción del medio circundante. Adicionalmente, estas cantidades se encuentran acopladas; en este sentido, regiones del individuo con idéntico espesor pueden introducir retardos muy diferentes; por ejemplo, la región en la que se ubica el núcleo podría corresponder a la zona de mayor índice de refracción y por ende realizar la mayor contribución a la señal de fase. Por lo tanto, para determinar el biovolumen algal a partir de la información de fase dada por la Ecuación 9.2, es necesario conocer los valores de $n(i, j)$ para cada píxel dentro del espécimen. Desafortunadamente, el fitoplancton es bastante heterogéneo, por lo que usualmente se precisan de técnicas sofisticadas para medir el índice de refracción integral [RMC⁺05]. Alternativamente, es posible conocer el índice de refracción promedio de fitoplancton mediante técnicas

de citometría de flujo y teoría de Mie [GSOD03], o mediante estimaciones teóricas de acuerdo a su composición metabólica [Aas96]. En el último caso, para fitoplancton en agua marina los valores de índice de refracción aceptados para una longitud de onda de 589 nm oscilan entre 1.366 y 1.473, con un valor medio de 1.419 dependiendo del porcentaje de contenido de agua en el alga.

Dado que el biovolumen es una cantidad *global*, la hipótesis de un índice de refracción promedio es atractiva ya que, dada la heterogeneidad del contenido intracelular, puede resultar un valor representativo para gran variedad de clases y géneros de microalgas. Sin embargo, implica, como una suposición subyacente, que cada individuo bajo estudio presenta una estructura interna idéntica, y además no tiene en cuenta las importantes diferencias que pueden existir en el contenido intracelular, tanto entre especies o géneros diferentes como dentro de la misma especie. Con base sobre este análisis, y para poder determinar el biovolumen de cada individuo, se propone estimar un *índice de refracción efectivo* \bar{n} para cada microorganismo bajo estudio. Si bien esta suposición no permite obtener el valor exacto de cada $h(i, j)$, el valor que se calcule usando un índice de refracción efectivo será igualmente representativo. A partir de la Ecuación 9.2, se sigue que el espesor *equivalente* de un individuo en cada punto está dado por:

$$h^*(i, j) = \frac{\lambda}{2\pi} \frac{\phi(i, j)}{\Delta\bar{n}}$$

siendo $h^*(i, j)$ un espesor equivalente para el píxel (i, j) , suponiendo que el índice de refracción de todo el microorganismo es uniforme, de modo que $\Delta\bar{n} = \bar{n} - n_0$ es constante. Esta conjetura también implica que mayores retardos de fase se corresponden con mayores espesores equivalentes sin afectar la precisión en la estimación del biovolumen. Un análisis más profundo sobre este aspecto se realizará en la próxima sección.

El biovolumen algal se calcula entonces sumando todos los volúmenes elementales

$h^*(i, j) \Delta x \Delta y$:

$$V = \sum h^*(i, j) \Delta x \Delta y = \frac{\lambda}{2\pi} \sum \frac{\phi(i, j)}{\Delta\bar{n}} \Delta x \Delta y \quad (9.3)$$

donde $\Delta x \Delta y$ conforman el tamaño del píxel en la imagen, el cual varía de acuerdo al aumento del OM utilizado.

Como se explicó en la Subsección 9.1.2, las especies *C. Hirundinella* se encuentran fuertemente comprimidas dorsoventralmente, por lo que es más común encontrarlas en posición frontal. Sin embargo, ocasionalmente pueden hallarse en posición dorsoventral. Por lo tanto, explotando esta característica, se propone un método para estimar $\Delta\bar{n}$ para cada individuo. El método consiste en combinar la información que se extrae de las dos posiciones de la microalga, dorsoventral y frontal respectivamente.

De la primera, es posible extraer la silueta que proporciona los valores de máximo espesor de la dimensión oculta de la microalga de la Figura 9.2d. Esto se logra al registrar y reconstruir un holograma del alga en posición dorsoventral. La región de interés (ROI) se extrae de los mapas de contraste de fase, como se muestra en Figura 9.3a. Con este propósito, primero se rota la imagen de fase hasta que la microalga yace en posición horizontal, entonces la imagen se binariza para obtener la silueta del individuo, como se muestra en la Figura 9.3b y c respectivamente. Todos estos pasos se llevan a cabo mediante procedimientos automáticos de PDI diseñados *ad hoc*, usando un umbral apropiado [Ots79] (Ver Sección 6.5) y aplicando diversas operaciones morfológicas como «erosion» y «dilation».

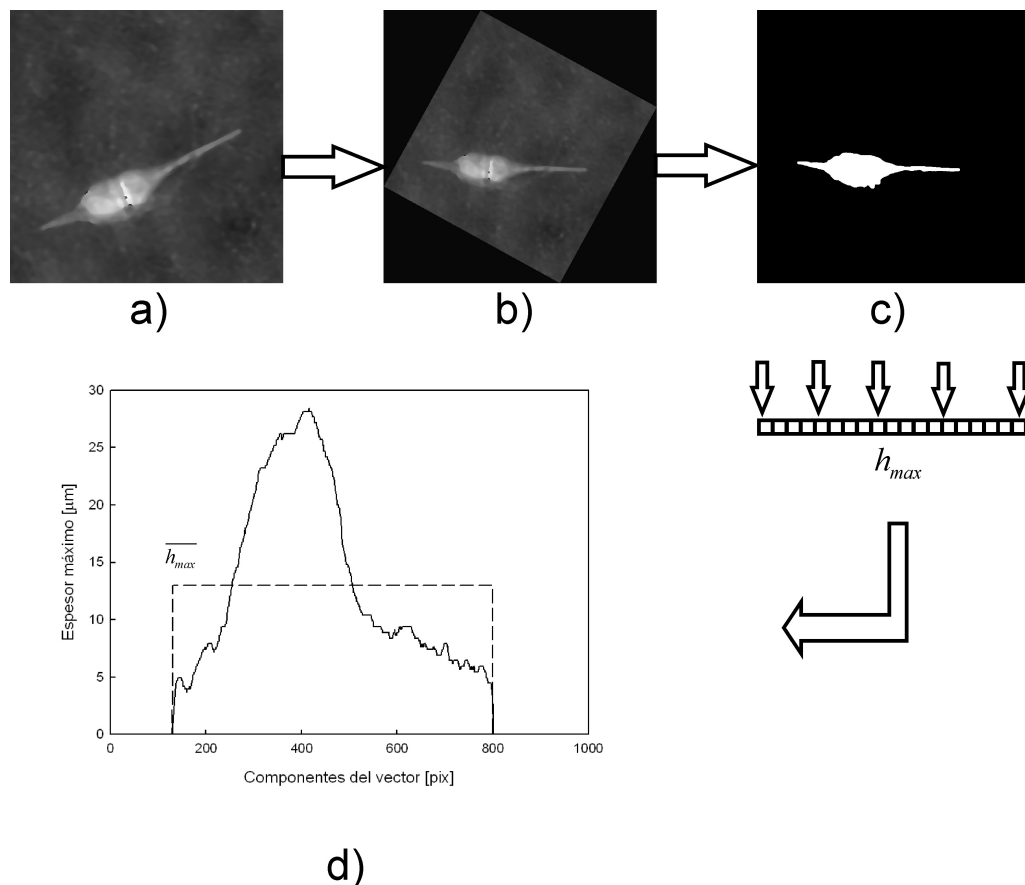


Figura 9.3.: Procedimiento para el cálculo del espesor equivalente. a) Imagen de contraste de fase de *C. Hirundinella* en posición dorsoventral (como aparece en el campo de un microscopio), b) imagen rotada, c) imagen binarizada, y d) línea sólida: perfil de espesores ($h_{máx}$); línea punteada: promedio de los espesores máximos ($\bar{h}_{máx}$).

Cabe recalcar que, como muchos especímenes biológicos, *C. hirundinella* aparecen esencialmente transparentes bajo microscopio de campo brillante, de modo que cuando se analizan en microscopios convencionales la extracción de la ROI 2D se torna dificultosa. Es por ello que, en estas experiencias las imágenes de fase son elegidas

por sobre las de amplitud ya que resultan más adecuadas para los procedimientos de segmentación por los motivos discutidos en la Sección 6.5.

A partir de la imagen binarizada, se calcula automáticamente un *perfil de máximos espesores* $h_{m\acute{a}x}$. Este se logra generando un vector cuyas componentes se obtienen sumando todos los valores de cada columna en la imagen. Los píxeles del fondo no contribuyen a la suma ya que están valuados en cero, mientras que los que se encuentran dentro de la microalga toman el valor uno. Así, el vector fila generado contiene en sus componentes los valores de los espesores pero en unidades de píxeles. El perfil de máximo espesor $h_{m\acute{a}x}$, el cual se ilustra en la Figura 9.3d se determina multiplicando el vector fila por el factor de escala de la imagen, i. e. la unidad de longitud que representa cada píxel dependiendo del OM utilizado.

A partir del individuo en posición frontal, el mapa de fase de la Figura 9.2d se rota hasta que la microalga yace horizontalmente sobre el eje longitudinal. Luego, se genera un vector fila; cada componente se obtiene seleccionando el máximo retardo de fase para cada columna. A modo de ejemplo, en la Figura 9.4 se muestra un vector típico $\phi_{m\acute{a}x}$ de máximos retardos de fase .

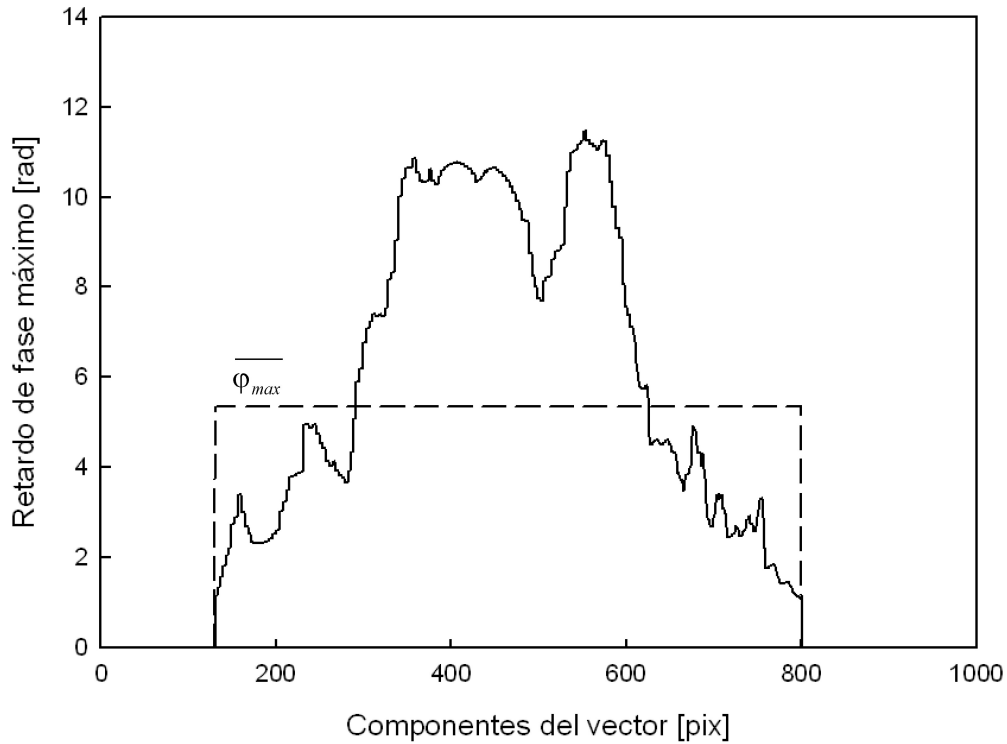


Figura 9.4.: Línea sólida: Perfil de los máximos retardos de fase ($\phi_{m\acute{a}x}$). Línea punteada: retardo de fase equivalente $\bar{\phi}_{m\acute{a}x}$.

Si bien no necesariamente es cierto que exista una correspondencia punto a punto entre $h_{m\acute{a}x}$ y $\phi_{m\acute{a}x}$, en el sentido de que el perfil de máximos espesores $h_{m\acute{a}x}$ este

asociado con máximos retardos de fase $\phi_{m\acute{a}x}$, en *promedio* puede esperarse una cierta correlación, siempre que se suponga al individuo con un *índice de refracción efectivo* \bar{n} constante. Por lo tanto, nuestra hipótesis se postula en términos de promedios; ambos perfiles $h_{m\acute{a}x}$ y $\phi_{m\acute{a}x}$ se promedian (líneas punteadas en la Figura 9.3 y la Figura 9.4), de modo que el promedio de los máximos espesores $\bar{h}_{m\acute{a}x}$ se corresponde con un retardo de fase equivalente $\bar{\phi}_{m\acute{a}x}$ (promedio de los retardos de fase máximos). Esta aseveración implica de manera implícita promediar la forma del alga para que adopte la forma de un paralelepípedo equivalente. En este sentido, si el alga fuera un paralelepípedo de altura $\bar{h}_{m\acute{a}x}$ e índice de refracción \bar{n} , introduciría un retardo de fase dado por $\bar{\phi}_{m\acute{a}x}$. Así, el $\Delta\bar{n}$ de cada microalga puede obtenerse directamente de la Ecuación 9.2, resultando:

$$\Delta\bar{n} = \frac{\lambda}{2\pi} \frac{\bar{\phi}_{m\acute{a}x}}{\bar{h}_{m\acute{a}x}} \quad (9.4)$$

Reemplazando la Ecuación 9.4 en la Ecuación 9.3, el biovolumen de cada individuo puede estimarse según:

$$V = \frac{\bar{h}_{m\acute{a}x}}{\bar{\phi}_{m\acute{a}x}} \sum \phi(i, j) \Delta x \Delta y \quad (9.5)$$

La Ecuación 9.5 muestra que el biovolumen, al ser una cantidad global, puede estimarse de manera sencilla con una metodología híbrida que combina los retardos de fase que introduce el alga con una medida *geométrica* relacionada con los máximos espesores de dicho organismo. Cabe enfatizar que esto se lleva a cabo sin la necesidad de tener un conocimiento previo del índice de refracción intracelular.

No obstante, tal como fue presentado, este cálculo requiere hacer girar cada individuo, ya sea dando suaves golpecitos en el cubre objeto con un alfiler o bien usando dispositivos externos. En lugar de ello, aprovechando por un lado el hecho que las microalgas de esta especie presentan una distribución de tamaños más o menos uniforme, y por otro que pueden encontrarse naturalmente en posición dorsoventral dentro de la distribución, se propone evitar la manipulación del individuo usando un espesor máximo representativo H . Este valor se calcula a partir de la silueta promedio de diferentes individuos; esto es, se calcula $\bar{h}_{m\acute{a}x}$ para las especies que aparecen naturalmente en posición dorsoventral en la muestra y se realiza el promedio de estos valores. Por consiguiente, la Ecuación 9.5 se modifica resultando:

$$V = \frac{H}{\bar{\phi}_{m\acute{a}x}} \sum \phi(i, j) \Delta x \Delta y \quad (9.6)$$

La Ecuación 9.6 sugiere que las microalgas adoptan una forma proporcional al mapa de fase óptico, que de hecho no es la morfología real de la microalga. No obstante, del análisis desarrollado y teniendo en cuenta que el biovolumen es una cantidad global y no local, se esperan estimaciones bastante precisas del biovolumen a partir de ella.

Si el objetivo final es contar con un dispositivo de visión automática, esto facilitaría el proceso de automatización, ya que para cada muestra, el espesor promedio podría calcularse automáticamente, sin la necesidad de interactuar con el espécimen para colocarlo en posición dorsoventral.

9.3. Resultados y Discusión

Para validar la hipótesis de que existe una distribución uniforme de tamaños, se llevaron a cabo medidas en imágenes obtenidas de un microscopio de campo brillante sobre 20 especímenes seleccionados aleatoriamente. Como resultado se obtuvieron una longitud máxima de $(170 \pm 2)\mu\text{m}$, un ancho máximo de $(44 \pm 1)\mu\text{m}$ y un espesor máximo del cuerpo de $(25,4 \pm 0,5)\mu\text{m}$, con coeficientes de variación de 5 %, 7 % y 4 % respectivamente. El bajo coeficiente de variación obtenido para el espesor del cuerpo apoya la hipótesis del uso de un valor promedio H en la Ecuación 9.6.

Siguiendo la metodología propuesta y descrita en la sección anterior, se tomaron 21 hologramas de distintas *C. hirundinella* y se calcularon los biovolúmenes individuales siguiendo la Ecuación 9.6. Los valores obtenidos se muestran como puntos llenos en la Figura 9.5. Con este propósito, los mapas de fase, como el que se muestra en la Figura 9.2d, se multiplicaron por una máscara binaria (obtenida por los mecanismos explicados en Sección 6.5) de modo de garantizar que sólo se sumen los valores de fase pertenecientes al individuo.

Con fines comparativos, también se incluyen los valores calculados usando aproximaciones geométricas, siguiendo las mismas metodologías propuestas por Vadrucci *et al.* [VCB07] y Sun *et al.* [SL03]. Estos cálculos se llevaron a cabo siguiendo la forma que se emplea frecuentemente para el género *Ceratium* que consiste en un elipsoide para el cuerpo, dos conos para los cuernos antiapicales y un cilindro para el cuerno apical.

Como puede verse, el biovolumen calculado mediante la metodología propuesta exhibe menor dispersión de datos que la obtenida por aproximaciones geométricas. Un análisis estadístico comparativo se encuentra sintetizado en la Tabla 9.1.

Cuadro 9.1.: Biovolumen promedio estimado para *C. Hirundinella*

	Sun et al. (2003)	Vadrucci et al. (2007)	MHD
Biovolumen promedio $\times 10^{-4} [\mu\text{m}^3]$	$(1,8 \pm 2,2)$	$(3,9 \pm 2,8)$	$(2,9 \pm 1,4)$
CV* (%)	55	33	24

*Coeficiente de Variación

Si bien Sun *et al.* y Vadrucci *et al.* calculan el biovolumen celular usando el mismo modelo geométrico, difieren en la suposición realizada para la medida de la dimensión oculta, lo cual explica los valores totalmente diferentes que surgen del cálculo. Por otro lado, los métodos geométricos demandan de la medida de al menos seis

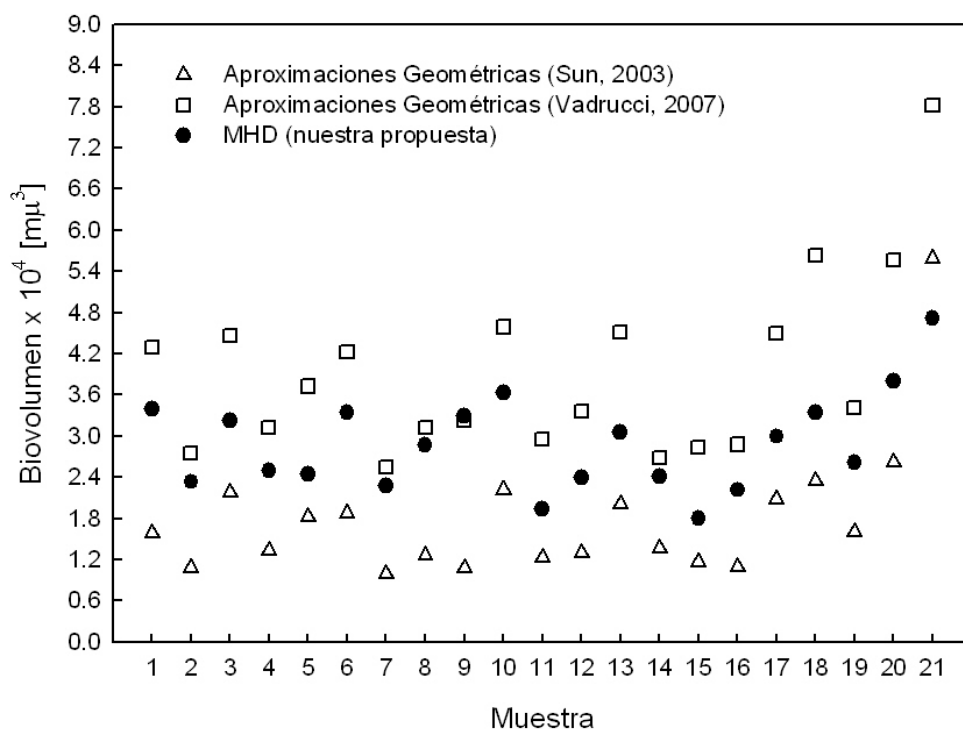


Figura 9.5.: Cálculo de biovolumen para *C. Hirundinella*

dimensiones lineales, incrementando naturalmente los errores en la estimación del biovolumen. De acuerdo a la Ecuación 9.6, nuestra metodología híbrida también precisa de la medida de la dimensión lineal H . No obstante, dado que esta surge de un proceso de promedio, se espera que constituya una cantidad más representativa.

Una ilustración del modelo propuesto por Sun *et al.* y Vadrucci *et al.* se muestra en la Figura 9.6.

Realizando un análisis más detallado de la utilidad potencial de la Ecuación 9.6, puede verse que de ella se desprende que el biovolumen es proporcional a la integral discretizada de la fase óptica. Físicamente, esta representa el contenido no-acuoso del individuo, el cual puede ser convertido apropiadamente en unidades de «masa seca» de la microalga, siempre que se conozca el índice de refracción [PPL⁺08]. Sobre este último punto, nuestro enfoque permite el cálculo de un *índice de refracción efectivo* \bar{n} para cada individuo estudiado, a partir de la Ecuación 9.4 y de una medida adicional del índice de refracción del medio circundante n_0 . Los resultados para \bar{n} se trazan en la Figura 9.7.

Para la muestra bajo estudio, n_0 se midió con un refractómetro de Abbe cuya lectura arroja $n_0 = 1,3345 \pm 0,0005$ correspondiente a una longitud de onda de 632.8 nm. Para respaldar nuestra hipótesis, los valores obtenidos de \bar{n} están de acuerdo con

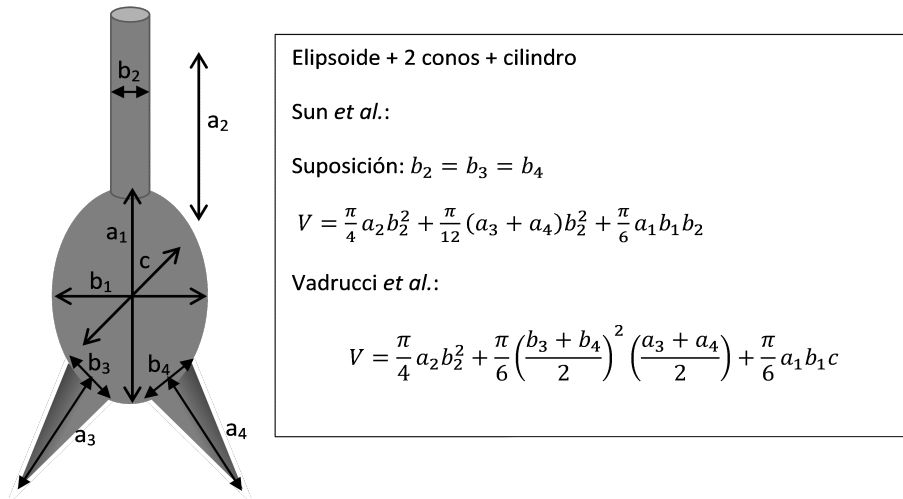


Figura 9.6.: Modelo geométrico del género *Ceratium* como se ejemplifica en el trabajo de SUN y LIU y VADRUCCI *et al.*

los reportados para fitoplancton. Adicionalmente, el valor promedio, $\bar{n}_{promedio} = 1,369 \pm 0,004$, cae dentro del rango de valores esperados para dinoflagelados [Aas96].

Es interesante notar que los valores atípicos que aparecen en la Figura 9.7 tienen un biovolumen dentro del rango normal en la Figura 9.5. En este sentido, estas microalgas podrían tener de hecho un índice de refracción más alto que el promedio, o bien las desviaciones observadas podrían proceder de la naturaleza híbrida de la metodología, lo que podría ser una consecuencia de las suposiciones realizadas cuando se derivó la Ecuación 9.6.

Para dar cuenta de los límites de validez del método, otro aspecto particular que vale la pena considerar es el criterio para decidir si las microalgas se encuentran en las posiciones requeridas por nuestra metodología. Sobre este punto la experticia de los especialistas juega un rol crucial. En las experiencias aquí desarrolladas la microalga ha sido considerada en posición dorsoventral cuando sólo uno de los cuernos antapicales aparece en la silueta. Cualquier desviación de la posición real se considera minimizada al tomar el promedio H de una serie de valores. En lo que concierne a la posición frontal, el valor más preciso que se puede obtener es sólo una aproximación basada en las habilidades de los especialistas expertos. Cabe recalcar que este aspecto no es sólo una problema inherente de la metodología propuesta sino también de los modelos geométricos. Sin embargo, las pequeñas desviaciones de la posición frontal podrían no ser cruciales para los presentes resultados, puesto que se hace necesario un compromiso entre la precisión y el sentido práctico para minimizar el esfuerzo de las medidas lineales en el microscopio.

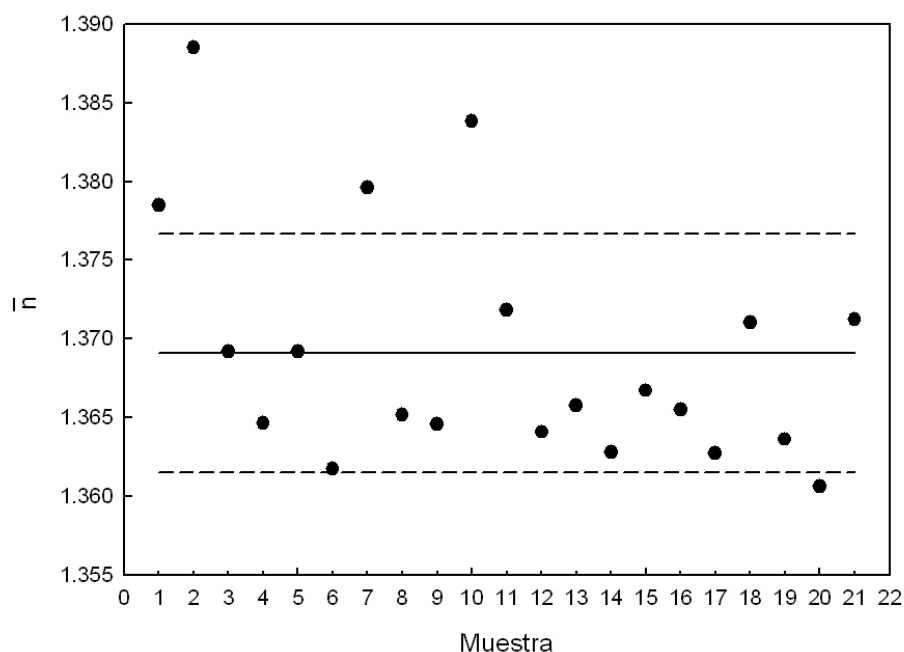


Figura 9.7.: Valores individuales de \bar{n} para cada *C. Hirundinella*. La línea sólida representa el valor medio de \bar{n} y las líneas discontinuas $\bar{n} \pm \sigma$

9.4. Conclusiones

La MHD se propone como una alternativa para efectuar medidas de biovolumen algal. Particularmente, en el caso del género *Ceratium* debido a su forma bastante variable y peculiar se requieren de complicadas ecuaciones para los cálculos de biovolumen por aproximaciones geométricas. Un modelo típico está compuesto de diferentes formas geométricas, demandando la medición de varias longitudes y diámetros por unidad. Incluso con este procedimiento relativamente largo y extenuante, el biovolumen no puede calcularse de manera adecuada. En particular, el achataamiento característico de la microalga y la excavación en el lado ventral no pueden medirse en muestras fijas, por lo cual deben hacerse diversas suposiciones. Por lo contrario, este no es un inconveniente para el método propuesto ya que el mismo toma en cuenta, independientemente de la forma 3D de *C. hirundinella*, los retardos de fase que dependen tanto de la morfología como del índice de refracción del alga. Así, el biovolumen se computa no sólo teniendo en cuenta el volumen geométrico, sino también su contenido intracelular.

A partir de estas consideraciones puede concluirse que este método podría proveer de una medida más representativa como un descriptor de biomasa. La metodología propuesta podría extenderse a la medida del biovolumen de cualquier especie siempre que pueda encontrarse con relativa facilidad en posición dorsoventral y que se pueda

verificar una distribución más o menos uniforme de tamaños.

Los resultados de esta investigación han sido sintetizados en un artículo publicado en Optics Communications (Ver Apéndice B).

10. Aplicaciones a la identificación de microalgas

10.1. Introducción

Reconocer objetos, independientemente de la orientación, tamaño o ubicación en una imagen es una habilidad que damos por sentado. Cuando vemos una imagen por ejemplo de una flor particular, independientemente del lugar en la que se encuentre, en un florero, al costado de una acequia, en un jardín o en un cuadro, y de su tamaño u orientación no nos resulta difícil aseverar que es una flor. Para una máquina, sin embargo, un mismo objeto que sufre una traslación, una rotación, o un escalamiento dentro de una imagen representa un objeto completamente diferente. Ahora supongamos que contamos con dos flores, para saber si una de ellas es una margarita y la otra es una rosa necesitamos un conocimiento más profundo que está dado por la experiencia.

Para que una máquina reconozca dos objetos como similares, o bien para que pueda clasificar objetos diferentes se precisa del desarrollo de algoritmos especiales cuya respuesta sea robusta a cambios de escala, rotación o traslación y al mismo tiempo presente escasas variaciones intra-clase; esto es, mientras más compacta sea una clase, mejor será el desempeño de la detección reduciendo el número de individuos clasificados incorrectamente.

El reconocimiento automático de patrones en diversos campos tales como la industria, la medicina, la biología, etc. ha ganado en los últimos años un importante interés principalmente en el desarrollo de sistemas de visión automática. En particular la identificación y conteo de organismos del plancton (fito y zooplancton), es indispensable para poder realizar estudios de diversidad, estructura de poblaciones y trama trófica, entre otros. Los especialistas en la materia usualmente acuden a su experiencia para desarrollar las tareas de identificación y clasificación mediante simple inspección visual de las muestras en el microscopio convencional. Existen también distintos analizadores de imágenes semi-automáticos para fito y zooplancton que sirven como soporte en las tareas de rutina; en su mayoría utilizan las mediciones de ciertas propiedades geométricas de los organismos tales como área, ancho, largo y relación largo-ancho y se basan en técnicas de procesamiento de imágenes obtenidas por microscopio convencional o microscopio invertido. Los procedimientos involucrados en general entrañan gran dificultad manual, por lo que el análisis *automático*

de estas imágenes constituye un interesante campo de investigación para ofrecer a los especialistas una solución al problema del análisis de grandes volúmenes de información.

No obstante, los objetos biológicos presentan una gran complejidad natural. Por un lado, existen en muchas formas, tamaños, texturas, etc. dentro de una misma especie, y por otro existen especies diferentes que se parecen entre sí. Es por ello que en el campo del reconocimiento automático, algunos enfoques se centran en la búsqueda de patrones que permiten encontrar en nuevos espacios de características alguna información que no es visible de manera directa en las imágenes. En general, estos espacios son los espacios de frecuencias que se encuentran mediante el análisis de las señales basado en transformadas integrales, tales como la Transformada de Fourier. El conocido Filtro Clásico Adaptado o de Vander Lugt [Lug64], aunque de gran utilidad en algunos casos, resulta muchas veces ineficiente debido a que el pico de correlación entre la imagen de referencia y la imagen de prueba se degrada drásticamente ante distorsiones geométricas de la imagen de prueba, como rotaciones y cambios de escala. Desde el campo de la Óptica se han hecho aportes significativos en esta línea, tales como el análisis de patrones de difracción [RR87], y el desarrollo de métodos para la identificación automática de microorganismos a partir de las imágenes de intensidad a las que se accede mediante un microscopio óptico [PPCÁBC01, FSC04, MPABGE06].

En este sentido, la Transformada de Fourier-Mellin (TFM), la que a nuestro conocimiento no ha sido aún aplicada a imágenes holográficas, emerge como una alternativa para el diseño de un filtro invariante. En términos generales, ésta consiste en la realización de un mapeo log-polar de la imagen, seguido de una Transformada de Fourier. Existen reportes de la relación entre la transformación log-polar necesaria para la implementación de la TFM y el sentido de la vista de algunos primates [AD96], así como de algunas similitudes entre la TFM y el oído debido a la transducción coclear de las señales que efectúan algunos mamíferos [Alt78]. Asimismo, la TFM ha sido utilizada para evaluar su capacidad como descriptor invariante en la clasificación de arritmias cardíacas [And11], y en la identificación de hojas de plantas [IMP00, LÁB09]. y de microorganismos [PPÁBCM03].

Las propiedades de invarianza ante cambios de escala y traslaciones y el hecho de que puede hacerse invariante a rotaciones mediante la transformación log-polar, le confieren a la TFM el potencial de constituirse como descriptor invariante para el reconocimiento automático de fitoplancton.

En este capítulo se examina el uso de la TFM y se la implementa para evaluar su capacidad de reconocimiento de la microalga de la especie *Ceratium hirundinella* independientemente de rotación, escalamiento, o traslación. También se evalúa su desempeño en la discriminación de clases, comparando con otra especie del género *Pediastrum*, la cual presenta una gran variabilidad inter-clase. Los primeros ensayos se realizan con caracteres conocidos, tales como las letras E y O de la clásica fuente *Times New Roman* en distintos tamaños y bajo distintos ángulos. Luego, una vez que

se elige una métrica de clasificación se ensaya el filtro en las microalgas mencionadas y se realiza un análisis de los resultados.

10.2. Materiales y métodos

10.2.1. Transformada de Fourier-Mellin

A finales de 1970, CASASENT Y SALTIS [CP76] mediante el uso de un sistema de lentes contribuyeron de manera sustancial a la implementación óptica de la Transformada de Fourier-Mellin (TFM). Diseñaron un filtro de correlación adaptado **invariante**, es decir un sistema formador de imágenes, en el que la imagen de un objeto se correlaciona con la imagen de otro objeto. Tal sistema se usa para indagar el grado de similaridad entre dos imágenes. Para lograr la invarianza a cambio de escala, realizaron un mapeo logarítmico de las imágenes de referencia y de las imágenes de prueba escaladas y sin escalar. Luego, al emplear un computador óptico que realice Transformada de Fourier mediante un arreglo de lentes, observaron que los resultados de las imágenes escaladas y sin escalar eran similares.

CASASENT y SALTIS demostraron que la Transformada de Mellin puede obtenerse vía Transformada de Fourier mediante un cambio adecuado de variables, con lo cual se alcanza la TFM. Dado que el módulo de la Transformada de Fourier es invariante a traslaciones, cualquier cambio de escala y/o rotación en una imagen son convertidos convenientemente en corrimientos o traslaciones en cada una de las coordenadas del espacio de Fourier. Estas últimas pueden eliminarse fácilmente considerando sólo la magnitud de la Transformada de Fourier, la cual es invariante a la traslación.

En las presentes aplicaciones, la TFM se usa para comparar diferentes imágenes que se encuentran trasladadas, rotadas y escaladas. Por simplicidad, y sin pérdida de generalidad supongamos primero el caso unidimensional para mostrar la invarianza a escala.

La TFM está basada en la Transformada de Mellin, que para una función unidimensional $f(x)$ está dada por:

$$\mathcal{M}(z) = \int_0^{\infty} f(x)x^{z-1}dx \quad (10.1)$$

Mientras que la transformada de Fourier de una función $f(x)$ se define:

$$F(\omega) = \int_{-\infty}^{\infty} f(x)e^{-i\omega x}dx \quad (10.2)$$

con $\omega = 2\pi f_x$. Ahora bien, si en la Transformada de Mellin 1D, dada por la Ecuación 10.1, se sustituye la variable x por la variable e^λ y se hace $z = -is$,

entonces se sigue que la Transformada de Mellin de $f(x)$ en el eje imaginario se puede escribir como la Transformada de Fourier de $f(e^\lambda)$:

$$\mathcal{M}(-is) = \int_0^\infty f(e^\lambda) e^{-i(s\lambda)} d\lambda = \int_{-\infty}^\infty f(e^\lambda) e^{-i(s\lambda)} d\lambda = \mathcal{F}\{f(e^\lambda)\} \quad (10.3)$$

Por lo tanto, en el caso unidimensional, la Transformada de Mellin puede obtenerse escalando de manera logarítmica la coordenada independiente de la función de entrada, para luego realizar al resultado una Transformada de Fourier.

Se define la transformada de Fourier-Mellin (TFM) como la magnitud de la transformada de Mellin de la magnitud del espectro de una señal, que puede escribirse como:

$$|\mathcal{M}_{|F(\omega)|}(-is)| = \left| \int_0^\infty |F(\omega)| \omega^{is-1} d\omega \right| \quad (10.4)$$

que según Ecuación 10.3 puede asimismo calcularse de manera alternativa vía una Transformada de Fourier si se escala de manera logarítmica la variable independiente del espectro.

Para demostrar la invarianza a escala calculemos la TFM de una función $g(x)$ una réplica escalada y trasladada de $f(x)$, tal que:

$$g(x) = kf(ax - x_o)$$

donde a y x_0 son los factores de escalamiento y traslación respectivamente, y k es un factor de amplitud. Para ello, según la Ecuación 10.4 y la Ecuación 10.3 debemos:

1. Realizar la Transformada de Fourier de g
2. Calcular la magnitud espectral $|G|$
3. Escalar de manera logarítmica la variable independiente de $|G|$.
4. Realizar una nueva Transformada de Fourier
5. Obtener el módulo.

La transformada de Fourier de $g(x)$ y $f(x)$ están relacionadas por:

$$G(\omega) = \frac{k}{|a|} \exp(-i\omega x_0) F\left(\frac{\omega}{a}\right)$$

donde $G(\omega)$ es la Transformada de Fourier de $g(x)$ y $F(\omega)$ la de $f(x)$. Se ha hecho uso de las propiedades de la Transformada de Fourier dadas por los Teoremas de Linealidad, Similaridad y Corrimiento (Ver Apéndice A: Subsección A.2.1, Subsección A.2.2 y Subsección A.2.3). La magnitud espectral de $G(\omega)$ es:

$$|G(\omega)| = \frac{|k|}{|a|} \left| F\left(\frac{\omega}{a}\right) \right|$$

La ecuación anterior muestra que la magnitud espectral es invariante bajo traslación, pero el factor de escalamiento distorsiona el espectro de Fourier mediante un factor $1/a$ en la variable independiente. El escalamiento puede desacoplarse aplicando una transformación logarítmica a la variable independiente de $F()$, de modo que $\log(\omega/a) = \log(\omega) - \log(a)$, resultando:

$$|G(\nu)| = \frac{k}{\exp(\nu_0)} |F(\nu - \nu_0)| \quad (10.5)$$

donde $\nu = \log(\omega)$, $\nu_0 = \log(a)$, con $a > 0$. Como consecuencia el escalamiento se traduce en una traslación en el espacio de transformación. Aplicando una Transformada de Fourier a la Ecuación 10.5 y usando el T. del Corrimiento (Subsección A.2.3), se obtiene:

$$G(u) = k \exp[-\nu_0(1 + iu)] F(u) = k \exp(-\nu_0) \exp(-i\nu_0 u) F(u)$$

donde $G(u) = \mathcal{F}\{G(\omega)\}$ y $F(u) = \mathcal{F}\{F(\omega)\}$. Es fácil ver que los escalamientos se traducen en cambios de fase, puesto que están representados como traslaciones en el nuevo espacio. Luego, teniendo en cuenta que $\exp(-\nu_0) = 1/a$, la magnitud espectral queda:

$$|G(u)| = \frac{k}{a} |F(u)|$$

que es invariante ante traslaciones y escalamientos y constituye la TFM.

Ahora bien, para extender la definición al caso de funciones bidimensionales, sea f una función en las coordenadas x e y que representa una imagen definida sobre un conjunto compacto de reales \mathbb{R}^2 . La transformada de Mellin bidimensional de la función $f(x, y)$ se define sobre el eje imaginario como [CP76]:

$$\mathcal{M}(-iu, -iv) = \int_0^\infty \int_0^\infty f(x, y) x^{-iu-1} y^{-iv-1} dx dy$$

En el caso bidimensional, debe tenerse en cuenta que si se rota una imagen un ángulo θ , su Transformada de Fourier también rota el mismo ángulo. Entonces, para alcanzar la invarianza a la rotación de la Transformada de Mellin vía Fourier, la rotación debe transformarse convenientemente en un corrimiento o traslación de una sola coordenada. Esta última claramente podrá eliminarse fácilmente al considerar sólo la magnitud de la Transformada de Fourier, la cual es invariante a la traslación.

El problema se resuelve teniendo en cuenta que cuando una función bidimensional se expresa en coordenadas polares (r, θ) , cualquier rotación de la imagen se manifiesta a sí misma en sólo la coordenada angular θ del sistema de coordenadas polar. En este sentido, una imagen es una matriz de puntos que naturalmente se considera en coordenadas cartesianas, con una coordenada horizontal x y una vertical y . Un punto cualquiera (x, y) admite una representación polar dada por su radio r y su

ángulo θ con respecto al eje x . La coordenada radial r y componente angular θ , están dadas por:

$$r = \sqrt{x^2 + y^2}$$

$$\theta = \arctan\left(\frac{y}{x}\right)$$

Así, si a una función bidimensional $f(x, y)$ se le realiza una transformación polar $f(r, \theta)$, cada punto del sistema cartesiano (x, y) ocupará un píxel unívocamente en el sistema coordenado (r, θ) . De esta manera cualquier rotación de la función afectará sólo a la coordenada angular θ y no simultáneamente a ambas coordenadas x e y como sucede en el caso rectangular. Al realizar la Transformada de Fourier a $f(r, \theta)$, el cambio rotacional en θ , que representa una mera traslación, se elimina considerando sólo la magnitud invariante a la traslación. Para ilustrar este hecho consideremos la imagen de la Figura 10.1a y su representación polar ilustrada en la Figura 10.1c; luego si se rota la imagen original unos 20° , como se muestra en la Figura 10.1b, su representación polar se modifica según lo ilustrado en la Figura 10.1d. Se advierte que, tal como anticipamos, la rotación se tradujo en un desplazamiento en la coordenada angular θ .

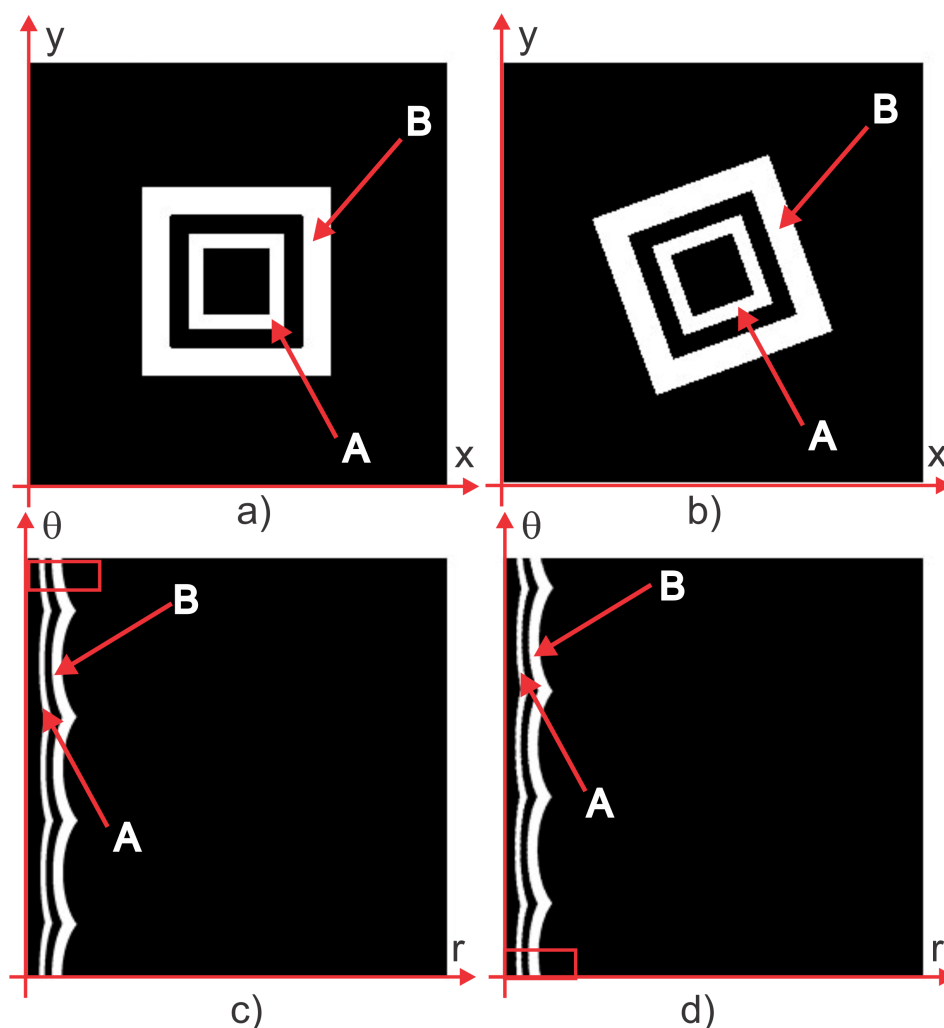


Figura 10.1.: a) imagen original; b) imagen rotada en 20°; c) Transformada polar de la imagen original; d) Transformada polar de la imagen rotada.

Si bien mediante la transformación polar se alcanza la invarianza a rotaciones, no ocurre lo mismo con la escala. Esto puede observarse claramente en las representaciones polares de los cuadrados A y B, que en la imagen original tienen diferente escala. La representación polar de los mismos (Figura 10.1c y d) es diferente, el cuadrado interior A abarca una región menor que la del cuadrado exterior B.

Mediante la realización de una transformada *log-polar* es posible alcanzar no sólo la invarianza a la rotación dada por la transformación polar, sino la invarianza a la escala de manera simultánea. El mapeo log-polar ha recibido interés en la comunidad científica ya que se cree que en la mayoría de los primates y los humanos las señales que se proyectan sobre la retina son «mapeadas» hacia la corteza visual en el cerebro de una manera log-polar. Matemáticamente, la descripción de este proceso es que una función imagen que aparece en la retina en plano cartesiano $f(x, y)$, aparece en la corteza visual como si hubiera sido muestreada en la intersección con distintos

puntos en los cuales el intervalo de muestreo angular crece linealmente, mientras que el radial lo hace exponencialmente, como una función $f(e^r, \theta)$. El mapeo exponencial tiene como resultado que los puntos cerca del centro de la imagen se encuentren sobremuestreados, en comparación con los puntos que se encuentran en la periferia de la imagen.

La transformación log-polar es un mapeo de los puntos en el plano cartesiano a puntos en el plano log-polar:

$$\rho = \ln(r) = \frac{1}{2} \ln(x^2 + y^2)$$

$$\theta = \arctan\left(\frac{y}{x}\right)$$

La imagen resultante es una matriz de $N \times M$. La cuadrícula log-polar está construida a partir de la intersección de M círculos concéntricos con radios que se encuentran exponencialmente separados como se ve en la Figura 10.2, y N líneas radiales con origen en el centro de la imagen.

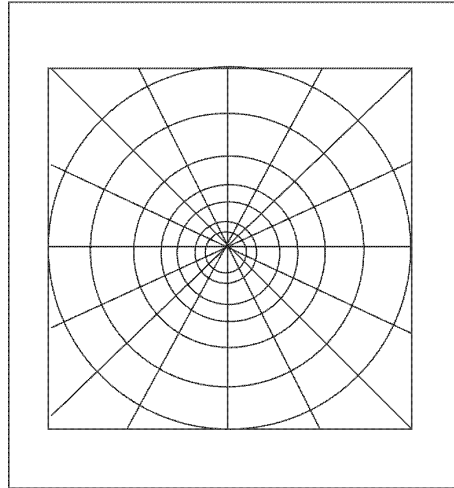


Figura 10.2.: Cuadrícula de muestreo log-polar

Para mostrar la invarianza de la TFM, consideremos una imagen $f(x, y)$ y la transformemos a un sistema coordenado log-polar. Supongamos, sin pérdida de generalidad, que la transformación se inicia desde el centro de la imagen, entonces cada píxel de la imagen se encuentra a una distancia r del centro de la imagen y a un ángulo θ . Si rotamos la imagen, sólo se modifica θ . Ahora bien si, en lugar de r , se toma $\ln r$, cualquier cambio de escala se transforma en una traslación, tal como se mostró previamente para el caso unidimensional.

Claramente, si escalamos una imagen por un factor a , un píxel en el punto cartesiano $P(x, y)$ de la imagen escalada estará representado por $P(\ln(ar), \theta)$. Por propiedades de logaritmo, el logaritmo de una multiplicación puede expresarse como suma

de logaritmos, de modo que el cambio de escala se convierte en una traslación. Así, un punto escalado cuya representación en el sistema coordenado log-polar es $P(\ln(ar), \theta)$, puede representarse como un corrimiento: $P(\ln(a) + \ln(r), \theta)$. Para ilustrar estas propiedades, en la Figura 10.3 se muestran claramente cómo los cambios en rotación y escala son convertidos en meras traslaciones mediante una transformación log-polar [AD96].

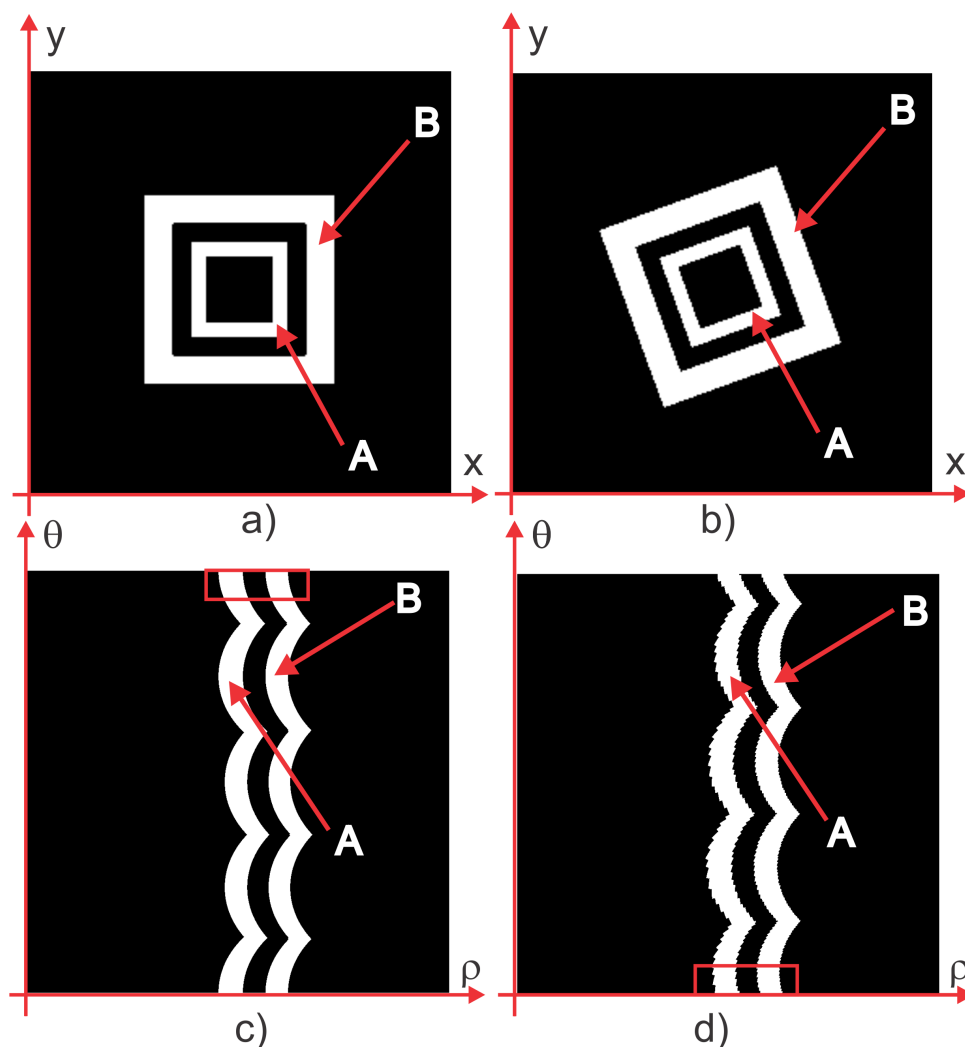


Figura 10.3.: a) imagen original; b) imagen rotada; Transformación log-polar c) de la imagen original, d) de la imagen rotada

La Figura 10.3 ilustra cómo un cambio de escala en la imagen original en coordenadas cartesianas, resulta en una traslación horizontal a lo largo de la coordenada logarítmica ($\rho = \ln(r), \theta$), sistema coordenado de la transformación log-polar. Para ello, consideremos los cuadrados de distinta escala A y B; la representación log-polar de ambos es idéntica, salvo por una traslación en el eje horizontal (Figura 10.3c y d). Por su parte, en la Figura 10.3b se muestra cómo una rotación en la imagen

original (en este caso de 20° hacia la izquierda), resulta en corrimiento vertical de la componente θ de la imagen transformada (Figura 10.3c y d).

En resumen, la transformada log-polar permite expresar las rotaciones y cambios de escala como corrimientos o traslaciones, los cuales pueden removerse fácilmente considerando sólo la magnitud de la Transformada de Fourier de la función expresada en el sistema coordenado log-polar. El cómputo de la TFM, involucra pasos idénticos a los necesarios para el caso unidimensional:

1. Realizar la Transformada de Fourier de la imagen: $F(\omega_x, \omega_y)$
2. Calcular la magnitud espectral: $F_{abs} = |F(\omega_x, \omega_y)|$
3. Realizar una Transformación log-polar: $F_{abs}(\rho = \ln(r), \theta)$, con $r = \sqrt{\omega_x^2 + \omega_y^2}$
4. Realizar la Transformada de Fourier del resultado anterior: $\mathcal{F}(F_{abs}(\rho = \ln(r), \theta))$
5. Obtener el módulo: $|\mathcal{F}|$

10.2.2. Problemas de la TFM discreta

En teoría, la TFM ofrece una medida invariante a rotaciones, traslaciones y cambios de escala. En la práctica, sin embargo, la versión discreta de la TFM es sólo una aproximación del caso continuo, en la que surgen además un conjunto de inconvenientes, entre los que se distinguen principalmente problemas de aliasing e interpolación.

Aliasing

Uno de los problemas asociados a la TFM es la probabilidad de aliasing o sub-muestreo durante la transformación log-polar. Tal como se ilustró en la Figura 10.2, durante una transformación log-polar típica se muestrea una imagen de modo que se toman más muestras cercanas al centro de la imagen que las que se toman cerca de la periferia. Por lo general, los píxeles cerca del centro están sobre-muestreados, mientras que los de la periferia sub-muestreados. Estos últimos generan problemas de aliasing de la imagen subyacente.

Interpolación

La implementación digital de la TFM requiere de la realización de una interpolación durante el muestreo log-polar. A partir de este surgen índices no enteros para las filas y las columnas de la imagen. Dado que todos los píxeles en la imagen se localizan en índices enteros, es necesario realizar algún tipo de interpolación. Como resultado, esta operación puede introducir errores en la TFM discreta.

La interpolación más simple consiste en la elección del valor entero más próximo, o vecino más próximo y la inclusión de estos puntos en la imagen re-muestreada

log-polar. Por su parte, la interpolación bilineal es una extensión de la interpolación lineal para funciones de dos variables, en la cual se hace una interpolación lineal en cada fila, y luego se utiliza el resultado para realizar una interpolación lineal a lo largo de cada columna. En esta se consideran los 4 píxeles más cercanos al píxel (x, y) a interpolar. Por último, en la interpolación bicúbica se utiliza una curva diferenciable definida en porciones mediante polinomios de grado mayor a 1, y se consideran los 16 píxeles más cercanos al píxel (x, y) a interpolar. En la Figura 10.4 se muestran los resultados de aplicar las diferentes interpolaciones. Más allá de un cambio en el contraste, la diferencia substancial se evidencia en la definición de los bordes, generando bordes más suaves en los casos bilineal y bicúbica.

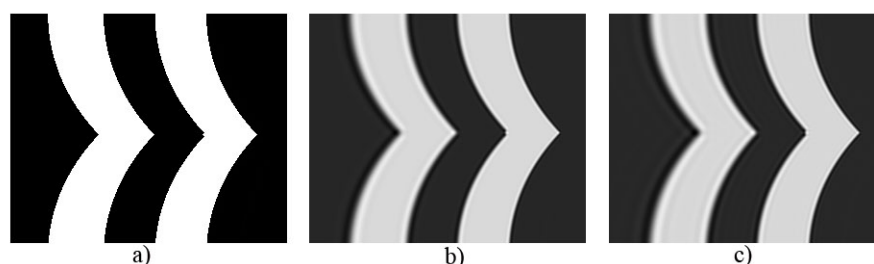


Figura 10.4.: a) Interpolación al entero más próximo; b) Interpolación bilineal; c) Interpolación bicúbica

10.3. Implementación del descriptor invariante

Con el objetivo de evaluar la capacidad de la TFM como descriptor invariante, se utilizó como conjunto de datos de ensayo un grupo de caracteres conocidos. En particular, se usaron letras E y O de distinto tamaño y rotadas diferentes ángulos, todas del tipo de fuente «Times New Roman». Se tomaron 34 letras E y 34 letras O de distintos tamaño, empezando con un tamaño de fuente 6, e incrementando el tamaño con intervalos de 2, hasta alcanzar un tamaño de fuente de 72. Por su parte, tanto la letra E como la letra O de tamaño 26 fueron rotadas en intervalos de 3° , tanto en sentido horario como en sentido antihorario para obtener un total de 28 caracteres, 14 versiones rotadas de cada una. Todas las letras fueron ubicadas en imágenes de $1000 \times 1000 \text{ px}^2$.

10.3.1. Clasificador automático: Primeros ensayos

Se realizó la TFM de cada una de las letras según el procedimiento expuesto en la sección anterior, con la siguiente modificación: en el paso 2 se aplicó un filtro Kaiser pasa alto al módulo de la Transformada de Fourier del objeto, con $\beta = 4$ que atenúa las bajas frecuencias y deja pasar las frecuencias altas para resaltar los

detalles del objeto [PPÁBCM03]. Por otro lado, el paso 3 la transformada log-polar se llevó a cabo realizando una interpolación bicúbica para evitar el aliasing debido al muestreo.

Las TFM constituyen descriptores o filtros invariantes a la rotación, traslación y escalamiento, por lo que, al menos en teoría, debe existir cierto grado de similitud entre los descriptores de la misma letra (poca variación intra-clase) y un cierto grado de discrepancia entre los descriptores de distinta letra (variación inter-clase).

Ahora bien, supongamos que queremos construir un clasificador automático de letras E invariante al tamaño; dados los descriptores obtenidos se necesita especificar un «blanco» o target; esto es, un descriptor representativo invariante de letras E. Este puede ser cualquiera de los 34 descriptores obtenidos para las letras E de distinto tamaño, o bien se puede «construir» un descriptor representativo. Luego, para decidir si una letra candidato es E u O, se deben comparar de alguna manera las TFM obtenidas con el target, de modo que el resultado de información discriminante entre distintos tipos de letras. Se utiliza la función de correlación cruzada que describe gráficamente la similitud geométrica entre dos funciones. En general, la similitud se manifiesta como elevaciones de energía localizada (picos de correlación), cuya altura proporciona la medida del grado de similitud entre ellas. El procedimiento se resume en el esquema de la Figura 10.5.

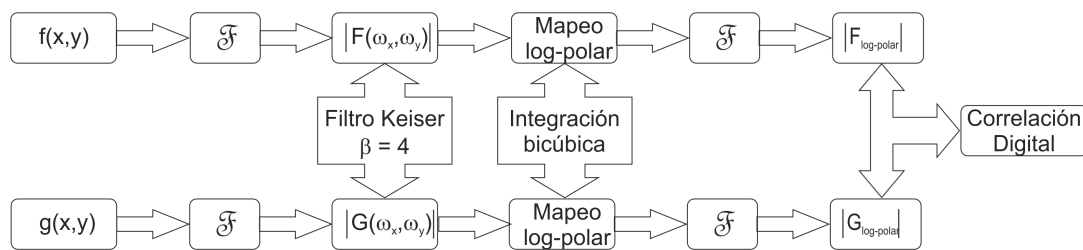


Figura 10.5.: Diagrama de bloques del sistema de correlación invariante

Por último, se debe establecer una métrica de desempeño del detector que mida la habilidad del filtro para distinguir la letra objetivo de una letra diferente.

Target

En cuanto a la elección del target se optó por un descriptor representativo de los 34 disponibles. Esta decisión se sustenta en el hecho de que en los ensayos realizados se determinó que el desempeño del clasificador varía drásticamente según el target elegido. Por ello, se consideró un target con información de la letra E para diferentes tamaños. Designemos por T a tal target; éste está compuesto por el **promedio** de los descriptores invariantes (TFM) de 11 letras E de distinto tamaño, a saber: 6, 12, 16, 20, 24, 28, 32, 36, 40, 52 y 64.

Correlaciones

A modo ilustrativo en la Figura 10.6 se muestran perfiles extraídos de los planos de correlaciones cruzadas entre el target y dos descriptores de letra E y O, de tamaño 26. Los perfiles se extraen tomando los máximos valores para cada columna de la matriz de correlación. En estos casos se observa que el pico de correlación es de menor tamaño cuando el target se correlaciona con los descriptores de la letra O. Sin embargo, la correlación del target con los descriptores de la letra E no arroja picos de energía fuertemente localizados, como esperábamos.

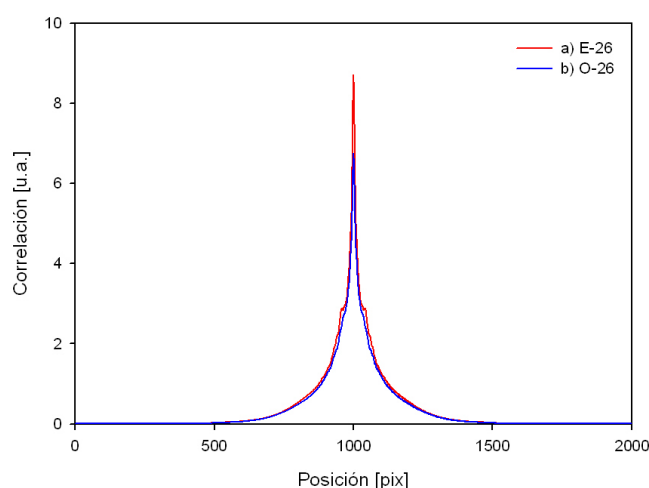


Figura 10.6.: Perfil extraído de las correlaciones cruzadas entre target y la TFM de: a) E tamaño 26, b) O tamaño 26

Métricas de desempeño

Para poder discriminar una letra de otra es preciso definir distintas métricas. Los valores que las mismas arrojen deberán ser muy diferentes cuando las letras sean distintas, y similares cuando las letras sean iguales. Así se establecerá un «gap» considerable entre letras iguales y letras distintas. Luego, podrá discriminarse una letra de otra a partir de un umbral predeterminado μ . Se establecieron cuatro métricas de desempeño. Las dos primeras, que definimos como m_1 y m_2 , miden la relación entre la energía contenida en el plano de correlación y la energía contenida en el pico $c(0,0)$ y en sus inmediaciones:

$$m_1 = \frac{\sum_{x,y} c(x,y)}{\sum_{x^*,y^*} c(x^*,y^*)} \leq \mu_1$$

donde x^* e y^* , son los valores de x e y mayores a la mediana de $c(x, y)$. Similarmente:

$$m_2 = \frac{\sum_{x,y} c(x, y)}{\sum_{x',y'} c(x', y')} \leq \mu_2$$

donde x' e y' , son los valores de x e y mayores a $c(0, 0)/2$, con $c(0, 0)$ la energía del pico.

La tercera métrica, m_3 , mide simplemente el valor del pico, asumiendo que valores altos de pico se corresponden con la letra E y valores más pequeños con la letra O:

$$m_3 = c(0, 0) \leq \mu_3$$

Por último, la cuarta métrica es una versión de la conocida Capacidad de Discriminación (DC: Discrimination Capability):

$$m_4 = DC = \left| 1 - \frac{AC}{CC} \right| \leq \mu_4$$

donde AC , es el máximo pico de autocorrelación (correlación del target consigo mismo), mientras que $CC = c(0, 0)$ el máximo pico de la correlación cruzada $c(x, y)$.

En todos los casos μ_i , con $i = 1, 2, 3, 4$, representa un umbral de decisión que nos permite discriminar entre dos señales o reconocer dos señales como la misma, dependiendo si los valores de las métricas m_i están por debajo o por encima de μ_i .

Resultados

Haciendo uso de las métricas definidas arriba, se obtuvieron los resultados que se observan en la Figura 10.7 los cuales evidencian que el filtro clasificador no consigue separar perfectamente las dos clases de letras, debido a que existe un solapamiento entre los valores de m de las letras E y O. En el mejor de los casos, μ debería determinarse de manera que la separación entre las dos clases sea máxima. El solapamiento de clases y la gran variación intra-clase determinan la existencia de falsos positivos y falsos negativos, cualquiera sea el valor elegido para μ en cada una de las métricas. Puede apreciarse, no obstante, que el solapamiento no es total, ni «caótico», pues se advierten nubes de puntos con un cierto grado de semejanza para cada letra, lo que podría dar cuenta de una correlación que requiera mayor análisis. Por ejemplo, m_1 muestra un crecimiento en valor proporcional al aumento de tamaño de la fuente. Si se supusiera una tendencia lineal, se podría entonces encontrar una curva de calibración lineal, m_1 vs. Tamaño de la Fuente, para cada fuente; sin embargo las letras más pequeñas representarían un obstáculo. En el caso de las otras métricas, las relaciones funcionales parecieran estar «emparentadas». Para los casos de las métricas m_3 y m_4 se advierte que si bien no es posible establecer un umbral de decisión, no existe tampoco un solapamiento entre clases. Se podría encontrar

alguna curva particular que diferencie las letras O de las E. En estos casos, no deberían tratarse de un umbral μ como en los casos anteriores, sino de una curva de decisión. Si bien no se han encontrado resultados que permitan respaldar una explicación clara de este comportamiento, el estudio profundo de este aspecto queda fuera del alcance de esta tesis. Las letras E y O son claramente muy diferentes desde el punto de vista morfológico, por lo que se esperaría que la diferencia entre clases sea mucho mayor. Es por ello, que no se profundiza sobre estos aspectos en pos de buscar nuevas alternativas más eficientes para la clasificación.

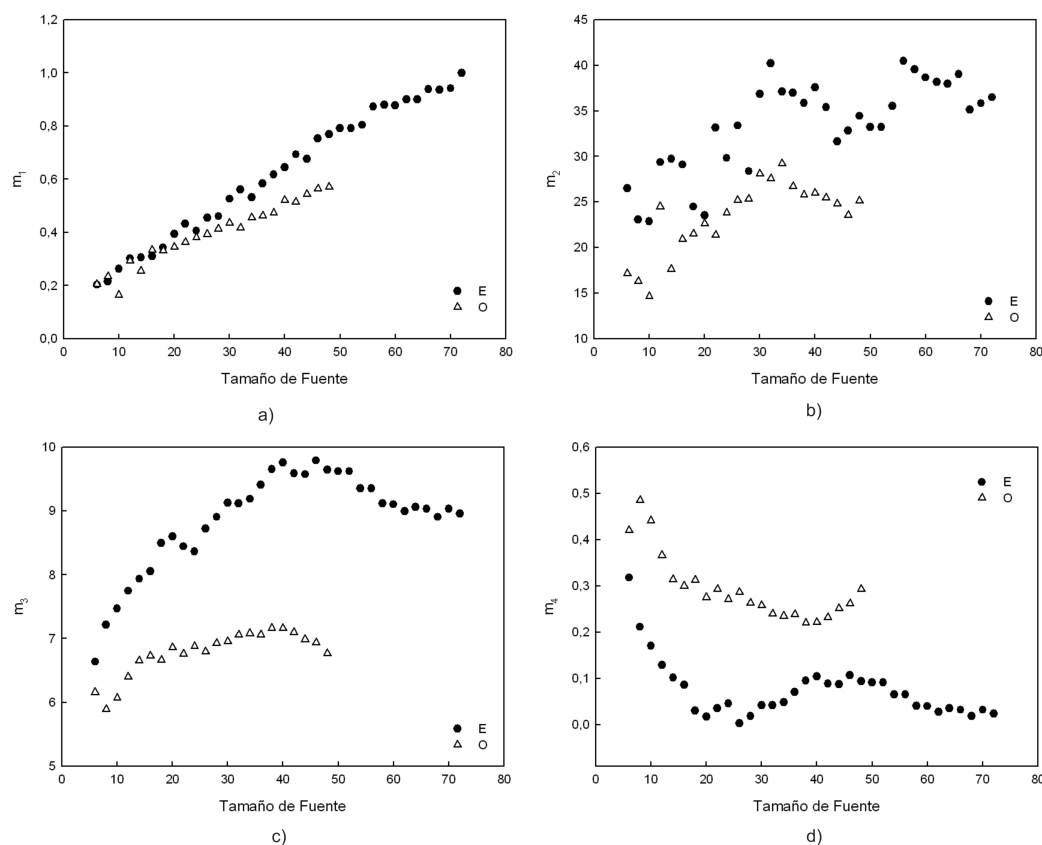


Figura 10.7.: Resultados del clasificador basado en el descriptor invariante TFM según métrica: a) m_1 , b) m_2 , c) m_3 y d) m_4

Discusión

De los resultados se concluye que el clasificador diseñado no representa un método adecuado para los fines que se persiguen. Además, la necesidad de computar correlaciones cruzadas trae como consecuencia costos computacionales elevados, ya que en general se hace uso del teorema de la convolución (Apéndice A, Subsección A.2.5), para lo cual deben realizarse tres Transformadas de Fourier (dos transformadas directas para las señales a correlacionar, y una transformada inversa para obtener la

correlación). En este sentido, no sólo se precisó de gran cantidad de tiempo para procesar las señales, sino además no se pudieron procesar las 68 señales de distinto tamaño por falta de memoria. Se procesaron todas las letras E (34), y sólo 24 letras O, de un total de 34 (desde el tamaño 6 al 52).

Con base en este análisis surge la necesidad de proponer un nuevo clasificador invariante basado en TFM que elimine la necesidad de computar correlaciones.

10.3.2. Nuevo clasificador automático

En virtud de los inconvenientes discutidos en el párrafo anterior, se propone un nuevo descriptor invariante basado en la TFM, que constituye una contribución original a este trabajo. El procedimiento para obtenerlo es sólo ligeramente diferente al de la sección anterior, y se sintetiza en los siguientes pasos:

1. Centrar imagen $f(x, y)$ (letras E y O)
2. Realizar mapeo log-polar: $f(\ln(r), \theta)$; con $r = \sqrt{x^2 + y^2}$
3. Realizar DFT: $F(\omega_x, \omega_y) = \mathcal{F}\{f(\ln(r), \theta)\}$
4. Tomar la magnitud: $|F(\omega_x, \omega_y)|$
5. Realizar la proyección de $|F(\omega_x, \omega_y)|$ en el eje ω_x , que se obtiene al efectuar la suma de todas las filas para cada columna: $D(\omega_x) = \sum_{\forall \omega_y} |F(\omega_x, \omega_y)|$
6. Normalizar el resultado

El resultado constituye descriptor invariante a rotaciones, traslaciones y cambios de escala y lo denominamos, en el contexto de esta tesis, Huella Vectorial Invariante (HVI).

Notar que a diferencia del procedimiento previo, en esta propuesta no se realiza una primera Transformada de Fourier antes de la Transformación log-polar. En el caso discutido en la sección anterior, cualquiera fuera la ubicación de las letras dentro de la imagen original, la invarianza a la traslación se lograba con la realización de esta primera Transformada de Fourier. Para esta nueva propuesta, en cambio, se calcula automáticamente el **centro de masa** del objeto (x_{CM}, y_{CM}) y se desplaza la imagen (como un todo) desde ese punto al centro de coordenadas $(0, 0)$. Con esto se logra la invarianza a la traslación que pudieran presentar las letras en las imágenes originales; además presenta la ventaja de evitar el costo computacional elevado que insume la realización de la Transformada de Fourier. Como consecuencia, al no realizar la T. Fourier tampoco se aplica el filtro pasa-altos, ni se lo aplica en ninguna otra instancia del proceso. Por último, y quizá una de las diferencias sustanciales con el método anterior, reside en construir un descriptor invariante o «huella» unidimensional D en lugar de bidimensional. Se considera que este descriptor cuenta con información representativa de la invarianza a la traslación, rotación y escalamiento, al mismo tiempo de que es más fácil de manipular matemáticamente. Recordemos además,

que con este nuevo clasificador no se realizan correlaciones cruzadas, por lo que las métricas definidas para evaluar el desempeño deben ser capaces de medir el grado de similitud directamente a partir de las HVI.

Con estas consideraciones, se construyó en este caso un clasificador automático invariante tanto a rotaciones como a escalamientos; se obtuvo la HVI para cada una de las letras E y O en sus versiones rotadas y escaladas. Una ilustración del procedimiento se muestra en la Figura 10.8a. Por su parte, con el objetivo de ejemplificar, en la Figura 10.8b se exhiben tanto el target, como las HVI de las letras: E tamaño 26 y 32 y O de tamaño 26 y 40. Se advierte que existe un cierto grado de similitud funcional entre letras del mismo tipo.

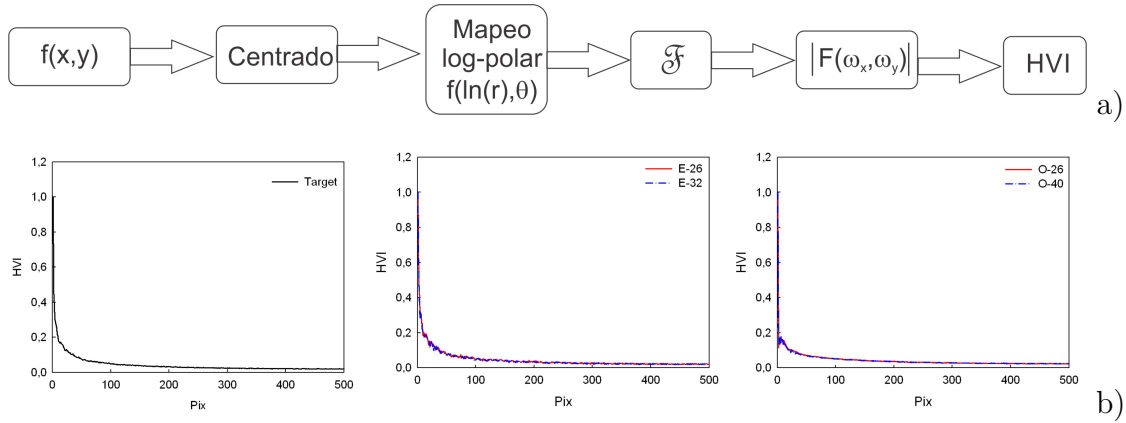


Figura 10.8.: a) Diagrama de bloques para la obtención del descriptor invariante HVI; b) target y HVI para dos letras E y dos letras O.

Resultados

Para determinar el grado de similitud se estableció una nueva métrica de desempeño, denotada por d . Para calcularla se requiere de un «target» con el cual comparar el candidato rotado o escalado (cualquiera de las HVI invariantes obtenidas). En este sentido, se definen dos «target»: uno representativo de la escala, denotado por T_E , y otro representativo para la rotación, denotado por T_R :

- T_E está compuesto por el **promedio** de las HVI de 11 letras E de distinto tamaño, a saber: 6, 12, 16, 20, 24, 28, 32, 36, 40, 52 y 64
- T_R está compuesto por el **promedio** de las HVI de 8 letras E de tamaño 26 rotadas diferentes ángulos, a saber: 0° , 3° , 12° , 27° , -3° , -15° , -27° y -39°

Por lo tanto, para determinar la similitud entre los target y las HVI de la base de datos, la métrica de desempeño resulta la distancia Euclidiana d entre ellas, resultando:

$$d_E = \sqrt{\sum_i (T_{E_i} - \text{HVI}_{E_i})^2}$$

$$d_R = \sqrt{\sum_i (T_{R_i} - \text{HVI}_{R_i})^2}$$

de manera que todas las imágenes de la base de datos pueden compararse con el target. Cuando $d_{E,R}$ es pequeña se supone que existe una similitud elevada, por lo que se trata de la misma letra que el target; en caso contrario, se trata de letras diferentes.

En la Figura 10.9 se muestran los resultados para ambas métricas. Se advierte que el clasificador automático es capaz de discriminar ambas letras en sus versiones rotadas, ya que existe un «gap» entre las distintas clases, siendo las clases, además, bastante compactas. Esto permite establecer fácilmente un umbral μ que defina la detección, por encima del cual se rechaza que el candidato se trata de una letra E. Para el caso de las letras escaladas, existe un solapamiento para las letras más pequeñas; principalmente para las de tamaño 6 y 8. Esto podría dar cuenta de las limitaciones del método ante variaciones muy grandes en la escala, o bien podría estar relacionado con una elección inadecuada de la métrica.

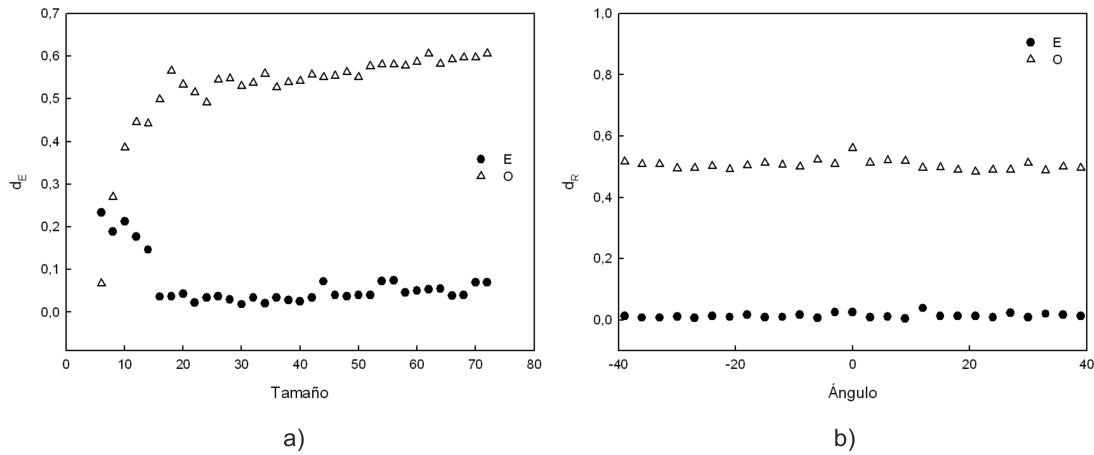


Figura 10.9.: a) d_E vs. HVI_E , b) d_R vs. HVI_R

10.3.3. Nuevas métricas de detección automática

De acuerdo a los resultados que acabamos de exponer, la distancia euclídeana mostró ser una métrica capaz de diferenciar entre las dos clases bajo estudio. No obstante, dada la gran diferencia morfológica entre la letra E y la letra O se esperaría una brecha mayor entre los valores de d para cada uno de ellos. Los resultados obtenidos muestran que la distancia euclídeana en cualquier caso da menor a 1. Si quisiéramos calcular la HVI para otra letra, digamos una F, dado que ésta es en cierto grado muy «similar» a la letra E, con la métrica propuesta sería imposible diferenciarla. Más aún, si quisiéramos extender los resultados a mayor cantidad de letras del abecedario.

Por otro lado, la elección del target siempre será una tarea subjetiva y el desempeño del clasificador quedará sujeto en muchos casos a una acertada elección del mismo.

Métrica MExA

Teniendo en cuenta estas consideraciones, el estudio se enfocó en encontrar una métrica que devuelva un «gap» mayor entre las letras analizadas y que principalmente no requiera de la elección de un target, eliminando así la intervención subjetiva del operador. Con este fin, de la observación de las HVI de las distintas letras, tales como las ilustradas en la Figura 10.8b, se pensó en la posibilidad de encontrar una curva de ajuste para cada una, cuyos parámetros den una medida de su comportamiento.

Dado el evidente comportamiento decreciente, entre la gran variedad de funciones que pueden describir el comportamiento de estas curvas, la elección de una sumatoria de exponenciales decrecientes de distinto orden se consideró una alternativa atractiva:

$$D(\omega_x) = \sum_{n=0}^{\infty} A_n \exp[-B_n \omega_x^n] \approx A_0 + A_1 e^{-B_1 \omega_x} + A_2 e^{-B_2 \omega_x^2} + A_3 e^{-B_3 \omega_x^3} + A_4 e^{-B_4 \omega_x^4} \quad (10.6)$$

donde claramente, los parámetros A_n y B_n dan una medida de las características comunes de las distintas FVI, como por ejemplo la rapidez de decrecimiento, entre otras. La idea subyacente es ajustar cada una de las HVI a una función de este tipo; como resultado, en vez de una única métrica, se obtiene un conjunto de métricas dadas por los parámetros de ajuste, que se han dado en llamar *Métricas Exponenciales Adaptadas* (MExA) y que constituyen un aporte original al trabajo. Puede que uno o más de estos parámetros sean capaces de discriminar entre las distintas clases, de acuerdo a los que tengan el mayor peso en la descripción funcional de la letra en cuestión. A modo de ejemplo, en la Figura 10.10 se muestran las HVI de una letra E y una letra O y sus correspondientes ajustes según la Ecuación 10.6; para estos casos, el comportamiento de la curva se encuentra mayormente ponderado exclusivamente por el parámetro B_4 para la letra E y por los parámetros B_3 y B_2 para la letra O. Esto da evidencia cuantitativa del comportamiento funcional diferente que anticipamos.

Métrica APC y Ancho Equivalente

Asimismo, se propone el uso complementario o alternativo de medidas de extensión de una función. Entre las más conocidas se encuentran, por ejemplo: la desviación estándar (σ) para datos que se supone se distribuyen normalmente; y el ancho que se corresponde cuando el valor de la curva decrece a $1/e$, para datos que se suponen decaen exponencialmente; por su parte, el *Ancho a la Mitad de la Altura Máxima* (Full Width at Half Maximum, FWHM), es útil para gran variedad de funciones.

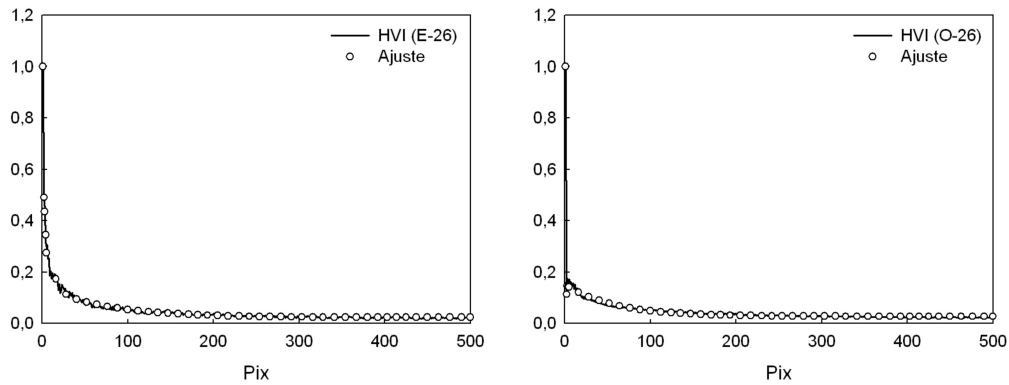


Figura 10.10.: HVI y curvas de ajuste para: a) E tamaño 26, b) O tamaño 26

Está dado por el ancho de la función a la mitad de la altura máxima. Esto es, se mide la abscisa en el punto donde la función cae a la mitad de su máximo valor. Esta medida resulta ineficiente en el marco de estas aplicaciones por el hecho de hacer uso de un sólo punto de las curvas HVI, permaneciendo el resto inutilizado. Por ejemplo, a la luz de la Figura 10.8b, se observa que para las HVI de ambas letras, el parámetro FWHM podría tener un valor muy parecido, dado que ambas curvas decrecen con rapidez similar. Las principales diferencias entre ambas, se encuentran más bien cuando las funciones han decaído mucho más. Es de esperar, entonces, que si se usaran otros puntos de esta función, la métrica fuera más representativa.

En estas aplicaciones, e inspirados en los métodos para definir parámetros que caractericen la actividad de patrones de speckle dinámico a partir de las funciones de autocorrelación [RAR00], se optó por usar para cada una de las HVI varias medidas de tipo FWHM. Éstas consisten en trazar rectas desde el máximo valor de la curva (que en todos los casos es 1 ya que se encuentran normalizadas) hasta distintos puntos pertenecientes a la misma. Para cada una de estas rectas características se calcula el FWHM, y al resultado se lo denomina «Ancho Parcial Característico» (APC). Cada uno de ellos constituye una métrica; al mismo tiempo, se puede elegir una métrica representativa de todos ellos tomando el promedio, cuyo resultado se denomina «Ancho Equivalente». El criterio para definir el número de APC y el espaciado entre ellos, surge de la observación del comportamiento de las curvas HVI.

Resultados

Siguiendo el procedimiento propuesto, en la Figura 10.11 se muestran los resultados para los parámetros MExA que mostraron mayor capacidad de discriminación. Se observa que en el caso de las letras escaladas, los parámetros B_2 y A_0 muestran capacidad para discriminar entre ambas clases. Análogamente, en el caso de las letras rotadas son los parámetros B_2 y B_3 los que cobran mayor relevancia.

Para el caso de las letras escaladas, se advierte de la Figura 10.11a que la letra E se presenta como una clase compacta para el parámetro B_2 , mientras que la letra O presenta cierta variabilidad intra-clase. Por otro lado, si bien en la figura pasa inadvertido, cabe destacar que el parámetro B_2 exhibe una diferencia de varios órdenes de magnitud para las dos clases de letras: su promedio para la letra E es de 0,009, mientras que para la letra O es 12,207 (con una mediana de 13,637). Por lo tanto, éste podría ser elegido para detectar o rechazar E independientemente de la escala. Por su parte, el parámetro A_0 genera «gap» menor, por cuanto no es buen candidato por sí solo para discriminar entre ambas letras escaladas, aunque bien podría ser usado como parámetro complementario.

Es interesante advertir también que la letra O más pequeña (tamaño de fuente 6) arroja un valor B_2 del mismo orden que el de las letras E, lo cual imposibilitaría su discriminación. No obstante, teniendo en cuenta el inconveniente similar acontecido para la distancia euclídeana, resulta pertinente un análisis adicional. Las letras de menor tamaño, podrían sufrir de un problema de aliasing en la transformación log-polar, en cuyo caso cualquier interpolación empleada sería insuficiente para recuperar la información completa ante una transformación inversa. Como consecuencia, las HVI obtenidas en esos casos podrían no representar en absoluto el objeto en cuestión.

En relación al desempeño de la métrica para letras rotadas (Figura 10.11b), el parámetro B_2 tiene un promedio de 0,007 para la letra E y 16,567 para la letra O, evidenciando nuevamente un «gap» de varios órdenes de magnitud. Cabe mencionar que los parámetros A_0 y B_1 (que no se muestran en la figura) mostraron asimismo cierta capacidad de discriminación, aunque mucho menor. Si bien para estos casos, la letra O aún presenta mayor variabilidad intra-clase que la letra E, ésta es mucho menor que en el caso de las letras escaladas. En este sentido, el clasificador responde con considerable mayor robustez a las letras rotadas.

En términos generales, y de acuerdo con los resultados tanto para letras escaladas como rotadas, se puede aseverar que el «gap» entre ambas letras se incrementó notoriamente, lo que permitiría incorporar al sistema clasificador otras letras del abecedario.

Por otro lado, para el caso de las métricas APC y Ancho equivalente, se tomaron para cada HVI de las letras E y O siete rectas entre el valor máximo de la curva y el valor que toma cada HVI a distintas abscisas (desde la abscisa del píxel 5 hasta el 55), y se calcularon para cada una de ellas los Anchos Parciales Característicos (APC), y luego el promedio o Ancho Equivalente. A modo de ejemplo, en la Figura 10.12 se muestran los resultados para el Ancho Equivalente y el APC correspondiente al FWHM que surge de la recta entre el valor máximo de la curva y el valor correspondiente a la abscisa 5 (APC-5). Nuevamente, para el caso de las letras de menor escala surge un ligero solapamiento que podría atribuirse, como ya sugerimos, a un problema de aliasing. Los resultados muestran una capacidad de discriminación aceptable, por lo que podrían incorporarse como métricas de soporte en el sistema clasificador.

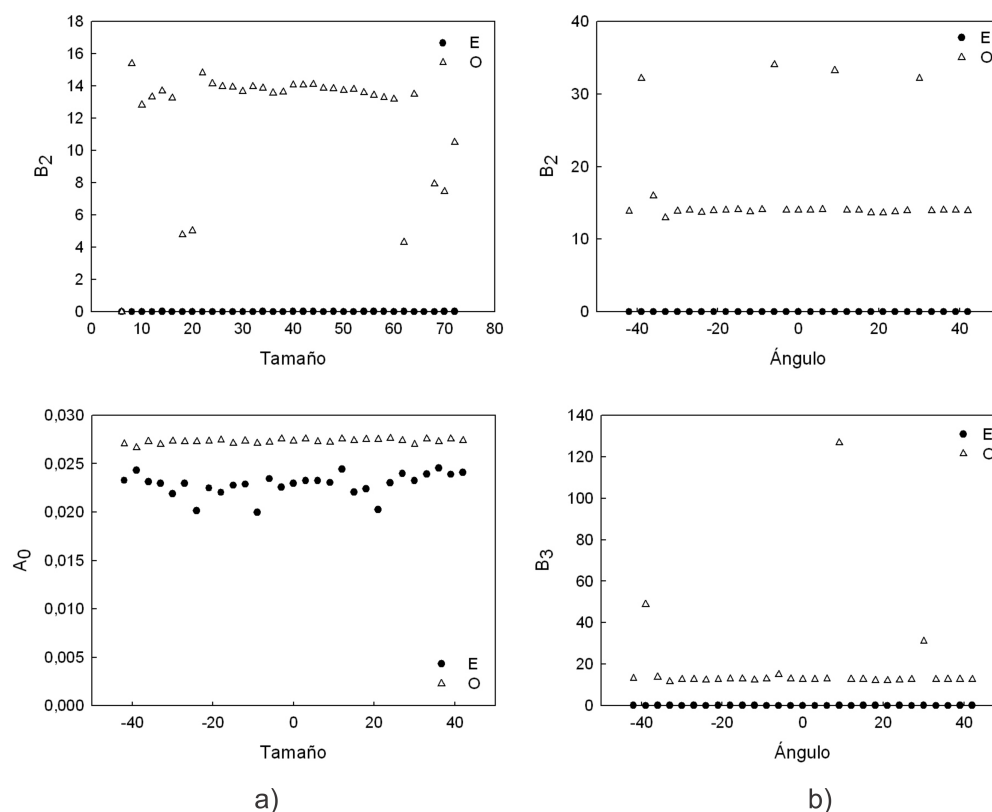


Figura 10.11.: MExA para: a) letras escaladas, b) letras rotadas

10.3.4. Discusión

Los resultados obtenidos usando HVI en combinación con las nuevas métricas propuestas muestran un incremento en el gap entre las distintas clases y una disminución a su vez de las variaciones dentro de una misma clase, constituyendo clases más compactas y más adecuadas para clasificar. Por lo tanto, estas herramientas matemáticas se eligen para evaluar su desempeño en la identificación de la microalga *Ceratium hirundinella*, contrastando con microalgas del género *Pediastrum*.

10.4. Aplicación a la identificación de microalgas

Lo expuesto hasta aquí evidencia la potencialidad de la TFM a través de las HVI como herramienta para el reconocimiento automático de especímenes. Además, aprovechando las potencialidades de la holografía, la hipótesis es que las imágenes fase compiten ventajosamente con las imágenes de intensidad que se obtienen en el microscopio de campo brillante y que son típicamente utilizadas en los experimentos de reconocimiento automático.

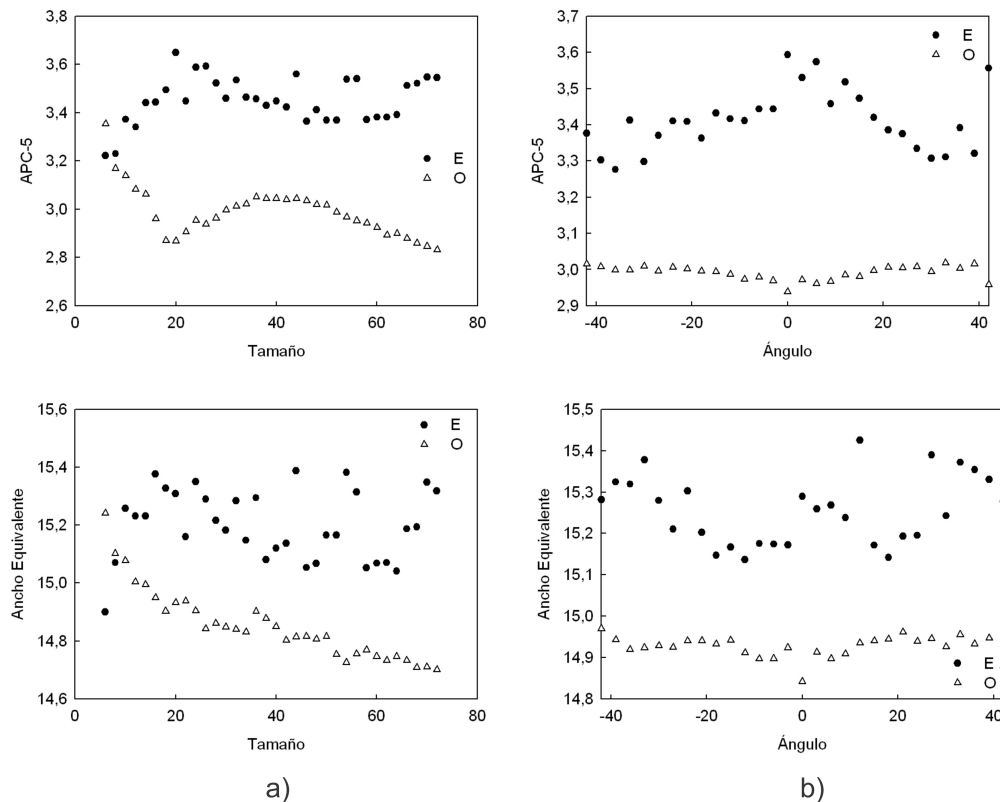


Figura 10.12.: APC-5 y Ancho Equivalente para a) Letras Escaladas, b) Letras Rotadas.

Para ello se toman hologramas de las especies *Ceratium hirundinella* y del género *Pediastrum*; estas últimas presentan una gran variación intraclase. *Pediastrum* son microalgas que construyen colonias con un número fijo de células y que se agrupan en una simetría más o menos circular, reminiscente morfológicamente a una estrella. El número de células varía, de modo que el tamaño también. Adicionalmente, cada célula puede presentar una o dos puntas; en el primer caso se denomina *Pediastrum simplex*, y en el otro *Pediastrum duplex*. La variabilidad dentro del género es un factor de probable conflicto en el desempeño del clasificador. Además, muchas células de la colonia suelen degradarse, adicionando complejidad al sistema. Para ejemplificar estas características, en la Figura 10.13 se muestra la fase continua segmentada de varios hologramas tomados para el género.

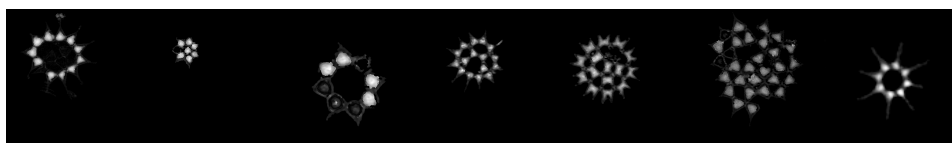


Figura 10.13.: Mapas de fase de hologramas del Género *Pediastrum*

Dado que no se contó con muestras multiespecíficas, los hologramas se toman con distintos OM, de modo de contar con versiones de las especies en distinto tamaño. Los mismos se registran en foco y son reconstruidos con el método PEA. Se aplican los algoritmos de corrección de aberraciones y de procesamiento digital de imágenes descritos en los capítulos anteriores. Los mapas de fase continua se obtienen haciendo uso del método de desenvolvimiento mediante mapas de calidad.

Luego, antes de aplicar el procedimiento para encontrar las HVI, se efectúa:

- Normalización de cada imagen: para tener una Imagen de Fase Normalizada (IFN)
- Segmentación por umbralización (Sección 6.5): para obtener la máscara que permite discriminar la información de interés del fondo.
- Producto punto a punto de la máscara por la IFN para aislar el objeto de interés con toda la información de fase.
- Redimensionamiento: Pegado en imagen negra de tamaño preestablecido de 1000×1000 .

A partir de aquí se realizó el procedimiento para obtener la HVI de cada una:

1. Centrado: Debido al ruido propio de la fase, se opta por calcular el centro de masa de las máscaras binarias debido a que éstas proveen información meramente morfológica.
2. Transformación log-polar
3. Cálculo de la Transformada de Fourier Discreta de la imagen obtenida en el paso anterior y obtención del módulo.
4. Obtención de la HVI

Los resultados de las métricas seleccionadas en la sección anterior se muestran en la Figura 10.14. Para el caso de la distancia euclídeana (Figura 10.14a), se utiliza un target consistente en un promedio de «ceratium» y se la compara con las imágenes que se desea clasificar.

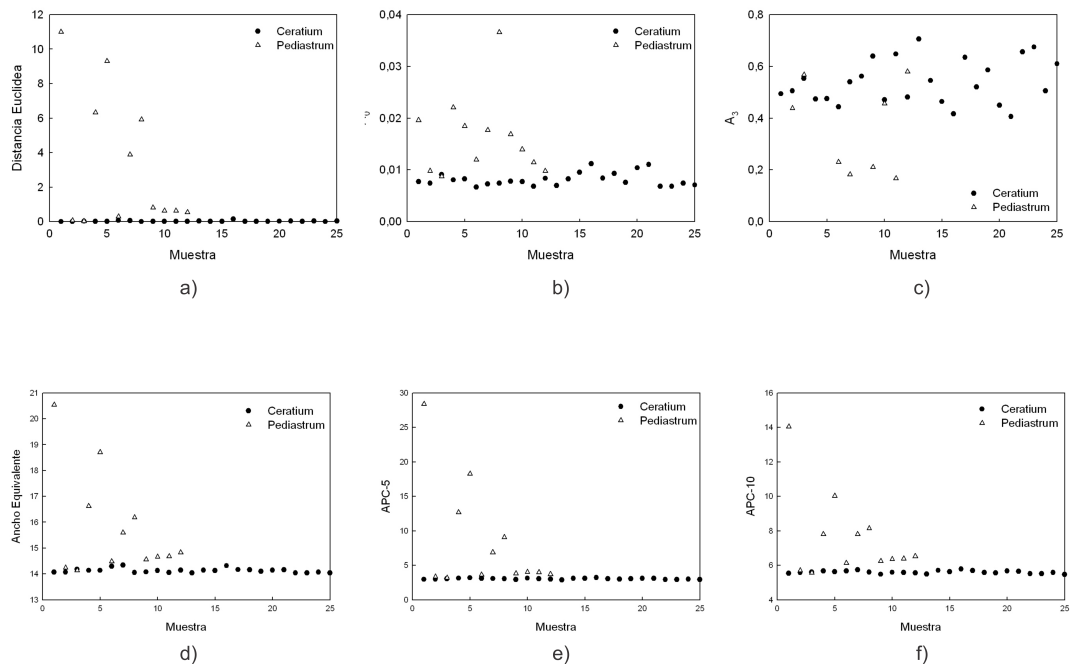


Figura 10.14.: Métricas para fase: a) Distancia Euclídeana; MExA: b) A_0 , c) A_3 ; d) Ancho Equivalente y Anchos Parciales Característicos: e) APC-5, f) APC-10

Asimismo, en la Figura 10.15 se muestran los resultados de las métricas que se obtienen cuando las HVI se calculan a partir de las máscaras binarias, en lugar de las máscaras de fase.

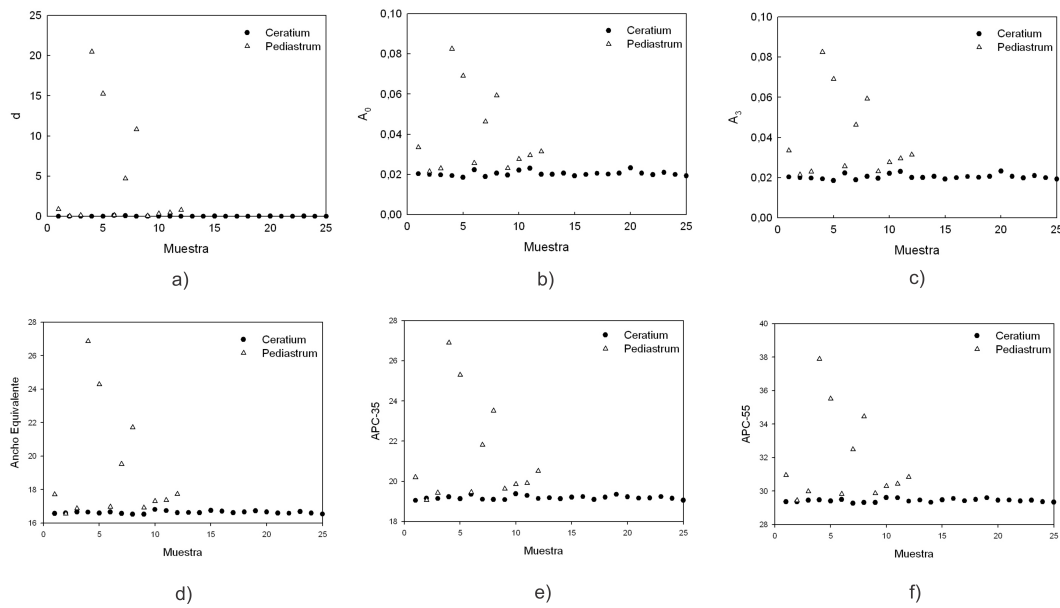


Figura 10.15.: Métricas para máscaras binarias: a) Distancia Euclideana; MExA: b) A_0 , c) A_3 ; d) Ancho Equivalente y Anchos Parciales Característicos: e) APC-35, f) APC-55

De los resultados, no es posible validar la hipótesis de que la información de fase compita de manera ventajosa con la silueta binaria, dado que para ambos casos el desempeño del clasificador resultó pobre, sin evidencias claras de un desempeño más óptimo para uno u otro caso. Sin embargo, ambos resultados presentan características comunes; se advierte, por ejemplo, una escasa variación intra-clase para la especie *C. hirundinella*, y una burda variación para las microalgas del género *Pediatrism*, tal como se había anticipado. De cualquier manera, el método no es capaz de discriminar exitosamente ambas especies. Los motivos pueden deberse a distintos factores. Claramente, es poco probable que un único algoritmo reconozca por sí solo cualquier variación del mismo objeto y que además tenga la capacidad de diferenciar entre diferentes objetos. En este caso, el cálculo de la relación largo ancho, podría proveer mayor capacidad de discriminación, teniendo en cuenta la simetría aproximadamente circular que presentan las microalgas del género *Pedias-trum*. Por otro lado, dada la escasa disponibilidad de muestras de otras especies, se sigue que el desempeño del algoritmo no puede evaluarse correctamente. Para una detección más certera de los problemas del clasificador, se debería ensayar de manera independiente su respuesta a cambios de escala y a rotación, tal como se hizo en el caso de las letras.

De cualquier manera, se considera que el método debe ser mejorado para otorgar-

le mayor robustez. Las soluciones propuestas apuntan a ensayar el reconocimiento por múltiples canales: módulo, fase, y/o holograma complejo reconstruido, sumando además otros descriptores, tales como la relación largo-ancho, biovolumen, área, y *descriptores de Fourier*. Si se tuviera un conjunto de características o descriptores, en vez de uno sólo como en el caso ensayado, se podría construir un sistema de reconocimiento automático que surja tras explorar algoritmos de **aprendizaje automatizado** tales como los que ofrecen las *Support Vector Machines* o las *Redes Neuronales* [TK08].

11. Discusión General

En este apartado se presentan las conclusiones generales de esta tesis, y las perspectivas de trabajo a futuro que surgen basadas en los resultados. En términos generales en esta tesis se han abarcado diversos aspectos de la Microscopía Holográfica Digital (MHD).

En cuanto al cumplimiento de los objetivos planteados al comienzo de esta Tesis, cabe mencionar que el objetivo general, desarrollo y puesta a punto de un microscopio holográfico digital por transmisión para el estudio y caracterización de especímenes biológicos y microestructuras, fue cumplido satisfactoriamente.

Se logró diseñar un prototipo experimental de Microscopio Holográfico Digital por transmisión, que se calibró para la caracterización de especímenes biológicos, de gran utilidad para el estudio de microestructuras transparentes que resultan invisibles bajo microscopio de campo brillante. El diseño involucró el estudio exhaustivo de los aspectos teóricos y prácticos necesarios para la implementación de la técnica. Para ello, debió evaluarse el equipamiento y material disponible para la construcción del prototipo experimental usado para el registro de los hologramas. Del mismo modo, la reconstrucción del holograma requirió de un estudio minucioso de los algoritmos de reconstrucción, su ensayo con fines comparativos, cuyo resultado fue la elección del método PEA como el más apropiado para los propósitos de esta investigación. Además, debió elegirse un lenguaje de programación en el cual conformar un “paquete” de programas que abarque no sólo la reconstrucción de los hologramas, sino la obtención de los mapas de fase continua, el procesamiento digital de imágenes y la corrección de aberraciones ópticas. Si bien los primeros ensayos fueron realizados en VISUAL BASIC, se tomó la decisión de “mudar” el proceso de reconstrucción al lenguaje PYTHON, un software libre con una vasta librería de procesamiento digital de imágenes incorporada. La tarea desarrollada en este campo, llevó a la automatización y semi-automatización de gran parte del proceso, sentando firmes bases para la construcción en el mediano plazo de un microscopio holográfico digital portátil que pueda ser utilizado en los laboratorios como una herramienta auxiliar en las tareas de rutina.

Los objetivos específicos, desarrollo de nuevas técnicas y sistemas ópticos alternativos y/o complementarios del análisis cuali-cuantitativo de microorganismos, incluían dos líneas principales: la detección de *T. cruzi* y la caracterización de microalgas, particularmente *C. hirundinella*, cuya evaluación de la estructura cuantitativa implicaba el cómputo del biovolumen, mientras que la cualitativa, su identificación.

Para el cumplimiento de cualquiera de ellos, resultó un requisito ineludible la obtención de mapas de fase continua. Esto implicó por un lado el estudio e implementación de métodos de desenvolvimiento de mapas de fase bidimensionales, y por otro la comparación y elección del más adecuado para cada fin. Se implementaron tres métodos, un método global, un método camino-dependiente, y un método con dos longitudes de onda. En el primer caso, se implementó el método por cuadrados mínimos, en el segundo el método por mapas de calidad, y en el último, un método de carácter original que hace uso de la información presente en dos mapas de fase envuelto, uno de los cuales sirve como guía para desenvolver el otro. Del análisis pertinente, se encontró que el método de desenvolvimiento mediante mapas de calidad devuelve los resultados más precisos, es más robusto al ruido, a pesar de implicar un costo computacional mucho mayor. El método por cuadrados mínimos es especialmente sensible a valores atípicos, y arroja resultados que no son congruentes con la fase envuelta subestimando los valores de fase en un escala global; no obstante, involucra costos computacionales mucho menores, siendo un algoritmo que se destaca por su velocidad. El método por dos longitudes de onda demanda del registro de un holograma adicional, lo que le confiere una complejidad adicional.

La técnica desarrollada para la detección del *T. cruzi* está basada en la detección de picos en mapas de fase continua pero dado que no requiere de medias cuantitativas de fase, se empleó el método de desenvolvimiento por cuadrados mínimos dada su notable ventaja en términos de velocidad. Por lo contrario, la evaluación cuali-cuantitativa de la microalga *C. hirundinella*, demanda de un algoritmo de desenvolvimiento del cual pueda extraerse información lo más fidedigna y precisa posible. Es por ello, que para el cumplimiento de este objetivo se empleó el método de desenvolvimiento mediante mapas de calidad. Adicionalmente, se encontró que el éxito del método de desenvolvimiento se encuentra condicionado a la elección adecuada del filtro aplicado al orden virtual (real). En este aspecto, la apodización del filtro mediante ventanas Kaiser, y la aplicación de filtros asimétricos le otorgaron una importante versatilidad al proceso y una notable mejora a los resultados.

No obstante, el análisis cuali-cuantitativo requirió además que los mapas de fase continua se encuentren libres de aberraciones, perturbaciones, y ruido. En este sentido, se realizó una exhaustiva labor, ya que durante el transcurso de la investigación, fueron surgiendo una serie de inconvenientes de variada índole. Por ejemplo, se debió trabajar con una cámara CMOS en aquellas circunstancias en las que la CCD fue requerida para otras investigaciones llevadas a cabo en el laboratorio. La naturaleza de lectura secuencial de este tipo de sensores repercutió en una aberración característica en los mapas de fase. De este hecho, surgió la necesidad de proponer un método para corregir esta aberración, por cuanto el enfoque de la investigación se desvió para atender este inconveniente. La propuesta de un método sencillo y rápido para corregir el efecto *rolling shutter* (o persiana) constituye un aporte valioso, ya que los sensores CMOS no sólo suelen ofrecer mayor resolución y menor ruido térmico, sino que también se encuentran disponibles en el mercado a un precio mucho menor. Los resultados alcanzados en este campo podrían ser fácilmente extrapolables a otras

aplicaciones interferométricas.

Por otro lado, se propusieron métodos para la corrección de las aberraciones propias de la configuración experimental empleada, tales como la aberración por geometría fuera de eje y la aberración esférica introducida por los Objetivos de Microscopio. En el último caso, el método es simple, rápido y automático, con la notable ventaja de no requerir del desenvolvimiento de fase a diferencia de los métodos reportados en la literatura. Se encuentra en elaboración un artículo para reportar estos resultados.

En su diversidad, los métodos propuestos permitieron en conjunto la obtención de mapas de fase adecuados para el análisis cuali-cuantitativo de microalgas; si bien fueron desarrollados para alcanzar estos objetivos en particular, estos programas y algoritmos podrían adaptarse a otras aplicaciones interferométricas o de procesamiento digital de imágenes.

Acerca de la aplicaciones

Las aplicaciones de la MHD desarrolladas en esta tesis se orientaron a la caracterización de microorganismos de importancia regional. Se estableció un contacto colaborativo con el Instituto de Patología Experimental (IPE), y con el Laboratorio de Calidad de Aguas (LCA), quienes proveyeron las muestras a caracterizar. Los objetivos específicos planteados al inicio fueron cumplidos parcialmente y de manera aceptable. Inicialmente, se planteó como objetivo el desarrollo de nuevas técnicas y sistemas ópticos alternativos y/o complementarios del análisis cuali-cuantitativo de microorganismos.

Se propuso una metodología para detectar el parásito *T. cruzi* mediante la diferenciación temporal de dos hologramas registrados en dos estados diferentes del parásito. Como parte de la colaboración interdisciplinaria con el IPE, los resultados alientan al desarrollo de un sistema de conteo automático del parásito en muestras infectadas, o como instrumento complementario de detección de parásitos en la fase aguda de la enfermedad de Chagas.

Por su parte, en lo concerniente a la caracterización de microalgas, la elección de la microalga *C. hirundinella*, respondió por un lado a la disponibilidad de muestras que fueron provistas por el LCA, y por otro a un interés creciente en esta especie por las recurrentes floraciones acontecidas en los últimos años, que han alterado de manera considerable la calidad del recurso hídrico.

En lo que respecta a los aportes para la evaluación de la *estructura cuantitativa* de microalgas, se propuso un método híbrido para el cálculo de biovolumen de la microalga *C. hirundinella*, que simultáneamente provee una estimación del índice de refracción promedio de cada individuo evaluado. Los resultados de biovolumen se encuentran dentro del rango obtenido por métodos geométricos convencionales, y las estimaciones de índice de refracción están de acuerdo con algunos reportes bibliográficos. Dado que el cómputo de biovolumen emerge de la medida cuantitativa del retardo de fase, la metodología podría proveer una medida más representativa de biomasa. Asimismo, el método podría ensayarse con otras especies siempre que

pueda extraerse una silueta del espécimen en posición dorsoventral. Cabe recalcar, no obstante, que aún debe realizarse gran trabajo en esta línea. Para que el método pueda competir con los métodos tradicionales, se precisa de un sistema aún más automatizado en el cual la tarea pueda llevarse a cabo con mayor velocidad.

En relación a la evaluación de la *estructura cualitativa* de microalgas, el objetivo planteado al inicio de esta tesis, quizá el más ambicioso, suponía el desarrollo de un sistema de identificación de especies, robusto ante cambios de escala, traslaciones y/o rotaciones de los especímenes bajo estudio. Se optó por implementar la Transformada de Fourier Mellin (TFM), dado que la misma cumplía con estos requisitos básicos. Para probar su eficacia, se la ensayó en primer término con caracteres conocidos. Al no obtenerse resultados alentadores, se diseñó un nuevo descriptor basado en la TFM, que denominamos Huella Vectorial Invariante (HVI) y se definieron nuevas métricas de evaluación de desempeño. A pesar de que el desempeño del sistema mejoró considerablemente en los ensayos efectuados con caracteres conocidos, en términos generales, el sistema no resultó robusto cuando se lo ensayó con las microalgas *C. hirundinella* y *Pediastrum*. Diversos motivos pueden estar relacionados con este hecho. Por un lado, la gran variación intraclase que presenta el género *Pediastrum* precisa de la elección de más de un descriptor para caracterizarla. Adicionalmente, dado que el algoritmo respondió favorablemente ante rotaciones, podría tener sus limitaciones en términos de escalamiento. En este sentido, la variación en tamaño podría ser demasiado grande.

Se espera, sin embargo, que el descriptor propuesto en esta tesis basado en la Transformada de Fourier Mellín y las métricas definidas para evaluar su desempeño puedan servir como una herramienta entre muchas otras para el diseño a futuro de un sistema de visión automática que pueda reconocer diversas especies.

En términos globales, esta tesis abarcó diversos aspectos de la MHD y sus aplicaciones. Las líneas de investigación que se desprendieron durante el desarrollo de este trabajo deben profundizarse con el objetivo final de construir un prototipo de Microscopio Holográfico Digital portátil que responda a las demandas de caracterización de microorganismos de importancia regional, incluidos el *T. cruzi*, la microalga *C. hirundinella* y otros micro-especímenes biológicos. En particular, para el caso de las microalgas, el desarrollo de un sistema opto-digital combinado facilitaría su caracterización automática. El tiempo que típicamente se dedica para realizar estas tareas se vería notablemente reducido por personal técnico de los organismos gubernamentales y la transferencia de tecnología a otros ámbitos (organismos privados administradores de sistemas de aguas, por ejemplo) para la toma de decisiones en la gestión ambiental.

A. Análisis de Fourier

El análisis de Fourier es la herramienta matemática más útil en el análisis de fenómenos lineales y no lineales. Esta herramienta es muy utilizada en el estudio de redes eléctricas y sistemas de comunicación. Por medio de la transformada de Fourier es posible analizar una señal descomponiéndola en un conjunto de señales complejas (o sinusoidales) de distinta frecuencia. Existen varias maneras de definir la transformada de Fourier que difieren en constantes de proporcionalidad o en el signo de la exponencial compleja. En este apéndice centramos nuestra atención en el análisis de funciones de dos variables independientes.

A.1. Condiciones de definición y existencia

La transformada de Fourier de una función compleja $f(x, y)$ está denotada con $\mathcal{F}f$ y se define por:

$$\mathcal{F}\{f\} = F(f_x, f_y) = \int_{-\infty}^{\infty} \int_{-\infty}^{\infty} f(x, y) \exp[-i2\pi(f_x x + f_y y)] dx dy \quad (\text{A.1})$$

donde a $F(f_x, f_y)$ se lo conoce como espectro de f . La transformada así definida es una función compleja de dos variables independientes f_x y f_y , las que se denominan frecuencias. En forma similar, es posible sintetizar la señal original f a partir de su espectro. Esto se lleva a cabo la transformada de Fourier inversa que se representa por $\mathcal{F}^{-1}f$ y se define como:

$$\mathcal{F}^{-1}\{F\} = \int_{-\infty}^{\infty} \int_{-\infty}^{\infty} F(f_x, f_y) \exp[i2\pi(f_x x + f_y y)] df_x df_y \quad (\text{A.2})$$

Notar que como operaciones matemáticas la forma de las transformadas directa e inversa son muy similares, diferenciándose solamente en el signo del exponente del integrando.

Antes de investigar las propiedades de las transformadas de Fourier directa e inversa definida por la Ecuación A.1 y la Ecuación A.2 vamos a analizar cuándo estas definiciones tienen sentido. Para ciertas funciones, las integrales definidas, no existen en sentido matemático usual, por lo tanto nuestra discusión será incompleta sin al menos una mención respecto de las condiciones de existencia. Para la existencia de Ecuación A.1, el conjunto más común de condiciones son las *condiciones de Dirichlet*:

1. f debe ser absolutamente integrable sobre el plano xy : $\int_{-\infty}^{\infty} \int_{-\infty}^{\infty} |f(x, y)| dx dy < \infty$
2. f debe tener sólo un número finito de discontinuidades y un número finito de máximos y mínimos en cualquier rectángulo finito
3. f no debe tener discontinuidades infinitas.

A.2. Teoremas

La definición básica de la transformada de Fourier dada por la expresión de la Ecuación A.1 ofrece una rica estructura matemática asociada a las propiedades de la transformada, propiedades de las que se uso frecuente en el presente manuscrito.

Las propiedades matemáticas de las que estamos hablando se expresan mediante teoremas. Para los siguientes teoremas sean f y g dos funciones en las variables x e y cuyas transformadas de Fourier están dadas por $F(f_x, f_y) = \mathcal{F}\{f(x, y)\}$ y $G(f_x, f_y) = \mathcal{F}\{g(x, y)\}$. La demostración de los mismos puede encontrarse en la mayoría de los textos.

A.2.1. Teorema de Linealidad

Si α y β son dos constantes complejas, se cumple:

$$\mathcal{F}\{\alpha f + \beta g\} = \alpha \mathcal{F}\{f\} + \beta \mathcal{F}\{g\} \quad (\text{A.3})$$

A.2.2. Teorema de Similaridad

$$\mathcal{F}\{f(ax, by)\} = \frac{1}{|ab|} F\left(\frac{f_x}{a}, \frac{f_y}{b}\right) \quad (\text{A.4})$$

Es decir un “estiramiento” de las coordenadas en el dominio espacial (x, y) resulta en una contracción en el dominio de frecuencias (f_x, f_y) mas un cambio en la amplitud de todo el espectro.

A.2.3. Teorema de Corrimiento

$$\mathcal{F}\{f(x - a, y - b)\} = F(f_x, f_y) \exp[-i2\pi(f_x a + f_y b)] \quad (\text{A.5})$$

o sea, la traslación de una función en el dominio espacial introduce un corrimiento de fase en el dominio de frecuencias. Por lo tanto, la magnitud:

$$|\mathcal{F}\{f(x-a, y-b)\}| = |F(f_x, f_y)| = |\mathcal{F}\{f(x, y)\}|$$

con lo cual el módulo de la transformada es **invariante** a las traslaciones.

A.2.4. Teorema de Parseval

$$\int_{-\infty}^{\infty} \int_{-\infty}^{\infty} |f(x, y)|^2 dx dy = \int_{-\infty}^{\infty} \int_{-\infty}^{\infty} |F(f_x, f_y)|^2 dx dy \quad (\text{A.6})$$

Este teorema generalmente se interpreta como un enunciado de la conservación de la energía.

A.2.5. Convolución

A.2.5.1. Definición de convolución

La integral de convolución de dos funciones $f(x, y)$ y $g(x, y)$, se denota como $f \otimes g$, donde \otimes denota convolución y está dada por:

$$f \otimes g = \int_{-\infty}^{\infty} \int_{-\infty}^{\infty} f(\xi, \eta) g(x - \xi, y - \eta) d\xi d\eta \quad (\text{A.7})$$

A.2.5.2. Teorema de Convolución

$$\mathcal{F}\{f \otimes g\} = \mathcal{F}\left\{\int_{-\infty}^{\infty} \int_{-\infty}^{\infty} f(\xi, \eta) g(x - \xi, y - \eta) d\xi d\eta\right\} = F(f_x, f_y) G(f_x, f_y) \quad (\text{A.8})$$

La transformada de la convolución de dos funciones en el dominio espacial, es equivalente al producto de las transformadas individuales.

A.3. Funciones Separables

Una función de dos variables independientes se dice de variable separable respecto a un sistema de coordenadas específico si puede ser escrita como el producto de dos funciones, cada una de las cuales depende de sólo una variable independiente. O

sea que una función $f(x, y)$ es separable en un sistema rectangular de coordenadas (x, y) si

$$f(x, y) = f_X(x)f_Y(y)$$

Mientras que será separable en coordenadas polares (r, θ) si

$$f(r, \theta) = f_R(r)f_\theta(\theta)$$

Las funciones separables son las más convenientes para operar con ellas que las funciones más generales, la separabilidad permite hacer que operaciones bidimensionales complicadas se reduzcan a operaciones unidimensionales simples. Por ejemplo una función separable en coordenadas rectangulares tiene la simple propiedad de que su transformada de Fourier bidimensional pueda ser calculada como el producto de transformadas de Fourier unidimensionales, como en el siguiente ejemplo:

$$\begin{aligned}\mathcal{F}\{f(x, y)\} &= \int_{-\infty}^{\infty} \int_{-\infty}^{\infty} f(x, y) \exp[-i2\pi(f_x x + f_y y)] dx dy \\ &= \int_{-\infty}^{\infty} f_X(x) \exp[-i2\pi(f_x x)] dx \int_{-\infty}^{\infty} f_Y(y) \exp[-i2\pi(f_y y)] dy \\ &= \mathcal{F}\{f_X\} \mathcal{F}\{f_Y\}\end{aligned}$$

B. Publicaciones

B.1. Revistas con Referato

1. Monaldi A. C., Romero G. G., Alanís E. E., Cabrera, C. M.; “Digital holographic microscopy for microalgae biovolume assesment”, Optics Communications, 336 (255-261), 2015
2. Cabrera C. M., Monaldi A. C., Romero G. G., “Compensación de la Aberración de Fase por efecto persiana de sensores CMOS en Microscopía Holográfica Digital”, Anales AFA Vol. 25 N°2 (75-79), 2014
3. Romero, G. G., Monaldi, A. C., Alanís, E. E.; “Digital Holographic Microscopy for Detection of Trypanosoma Cruzi Parasites in Fresh Blood Mounts”, Optics Communications, 285. (1613-1618), 2012
4. Monaldi A.C., Romero G.G., Alanís E.E., Curkovic G.J.; “Microscopía Holográfica Digital aplicada a la Detección de Microorganismos Móviles”, Anales AFA Vol. 21 (74-80), 2010

B.1.1. En revisión

1. Monaldi A. C., Romero G. G., Alanís E. E, Cabrera, C. M.; “Rolling Shutter Effect Aberration Compensation in Digital Holographic Microscopy”, en proceso de revisión Optics Communications

B.2. Presentaciones a Congresos

1. Monaldi, A. C.; Cabrera, C. M. ; Romero, G. G.; “Evaluación de la Transformada Fourier Mellin como descriptor invariante para reconocimiento de microalgas en imágenes holográficas”, Libro de Resúmenes de la 98 Reunión Nacional de Física de la AFA, Modalidad Póster; Septiembre 2013
2. Cabrera, C. M.; Monaldi, A. C.; Romero,G. G.; “Compensación de la Aberración de Fase por efecto persiana en Hologramas digitales registrados con sensores CMOS”, Libro de Resúmenes de la 98 Reunión Nacional de Física de la AFA, Modalidad Póster; Septiembre 2013

3. Monaldi, A. C.; Romero, G. G.; Alanís, E. E.; Cabrera, C. M.; “Obtención de mapas de fase sintéticos en Microscopía Holográfica Digital, utilizando dos longitudes de onda”; Libro de Resúmenes de la 97 Reunión Nacional de Física de la AFA, Modalidad Póster; Septiembre 2012
4. Monaldi, A.C. ; Romero, G. G.; Cabrera, C. M.; “Compensación automática de la aberración de fase en Microscopía Holográfica Digital en configuración fuera de eje”; Libro de Resúmenes de la 97 Reunión Nacional de Física de la AFA, Modalidad Póster; Septiembre 2012
5. Cabrera, C. M.; Monaldi, A.C. ; Romero, G. G.; “Evaluación del desempeño de filtros e implementación de un método de auto-foco en la reconstrucción de hologramas en Microscopía Holográfica Digital”; Libro de Resúmenes de la 97 Reunión Nacional de Física de la AFA, Modalidad Póster; Septiembre 2012
6. Monaldi, A. C.; Romero, G. G.; Alanís, E. E., Moraña, L., Salusso, M.; “Microscopía Holográfica Digital para la caracterización de microalgas”; Libro de Resúmenes de la II Reunión Conjunta SUF-AFA, Modalidad Póster; Septiembre 2011
7. Domínguez, D. O.; Monaldi, A. C.; Romero, G. G.; Alanís, E. E. ; “Determinación Interferométrica de índice de refracción de sustancias transparentes: Propuesta de una técnica para ampliar el rango de medidas”; Libro de Resúmenes de la II Reunión Conjunta SUF-AFA, Modalidad Póster; Septiembre 2011

Bibliografía

- [AABA] O. Ait-Aider, A. Bartoli, and N. Andreff. Kinematics from lines in a single rolling shutter image. In *IEEE Conference on Computer Vision and Pattern Recognition, 2007. CVPR '07*.
- [Aas96] E. Aas. Refractive Index of Phytoplankton Derived From its Metabolite Composition. *Journal of Plankton Research*, 18(12): 2223–2249, 1996.
- [ABC⁺92] E. Alanís, M. Basombrío, N. Cap, C. Matthews, M. Montero, H. Rabal, and G. G. Romero. Detection of Trypanosoma Cruzi in Blood, by Means of Dynamic Laser Speckle. pages 340–341, 1992.
- [ABMPCPPP02] J. Alvarez-Borrego, R. R. Mourino-Perez, G. Cristobal-Perez, and J. L. Pech-Pacheco. Invariant recognition of polychromatic images of vibrio cholerae o1. *Optical Engineering*, 41(4): 827–833, 2002.
- [AD96] H. Araujo and J.M. Dias. An introduction to the log-polar mapping. In *Proceedings Second Workshop on Cybernetic Vision 1996*, pages 139–144, 1996.
- [Alt78] R.A. Altes. The fourierâmellin transform and mammalian hearing. *Journal of the Acoustical Society of America*, 63(1): 174–183, 1978.
- [Álv06] J. P. Álvarez. Implementación de la técnica de Holografía Digital - Aplicaciones en metrología óptica. Master’s thesis, 2006.
- [And11] Soto Muster Gustavo Andrés. Clasificación de Arritmias Cardíacas. Master’s thesis, 2011.
- [ARÁ⁺01] E. E. Alanís, G. G. Romero, L. Álvarez, C. Martínez, D. Hoyos, and M. Basombrío. Detection of Motile Microorganisms in Biological Samples by Means of a Fully Automated Image Processing System. volume 4419, pages 22–25. SPIE, 2001.
- [ARÁ⁺04] E. E. Alanís, G. G. Romero, L. Álvarez, C. Martínez, and M. Basombrío. Optical Detection of Trypanosoma Cruzi in Blood Samples for Diagnosis Purpose. The International Society for Optical Engineering, 2004.
- [Bol05] A. Boltovskoy. Ceratium hirundinella schrank: Un dinoflagelado invasor en lagos y embalses. *Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica*, 40: 9, 2005.

- [C.79] Vest C. *Holographic Interferometry*. John Wiley & Sons, 1979.
- [Can86] J. Canny. A computational approach to edge detection. *IEEE Transactions on Pattern Analysis and Machine Intelligence*, 8(6): 679–698, 1986.
- [CBD99] Etienne Cuche, Frédéric Bevilacqua, and Christian D. Depeursinge. Digital Holography for Quantitative Phase Contrast Imaging. *Optics Letters*, 24(5): 291–293, 1999.
- [CCC⁺06] T. Colomb, E. Cuche, F. Charrière, J. Kühn, N. Aspert, F. Montfort, P. Marquet, and C. Depeursinge. Automatic Procedure for Aberration Compensation in Digital Holographic Microscopy and Applications to Specimen Shape Compensation. *Applied Optics*, 45(5): 851–863, 2006.
- [CDCH] O. Coquoz, C.D. Depeursinge, R. Conde, and E.B. Haller. Microendoscopic holography with flexible fiber bundle: experimental approach. In *Proceedings of SPIE 2083, Microscopy, Holography, and Interferometry in Biomedicine*.
- [Cha07] Florian Charriere. *Shot Noise, Refractive Index Tomography and Aberrations Estimation in Digital Holographic Microscopy*. PhD thesis, Ecole Polytechnique Federale de Lausanne, Suisse, 10 2007.
- [Chi04] J. Chiarpenello. Enfermedad de Chagas (Tripanosomiasis Americana). *EVIDENCIA-Actualización de la Práctica Ambulatoria*, 7(4), 2004.
- [CJK08] J-B. Chun, H. Jung, and C-M. Kyung. Suppressing rolling-shutter distortion of cmos image sensors by motion vector detection. In *IEEE Transactions on Consumer Electronics, 2008*, volume 54, pages 1479 – 1487, 2008.
- [CKC⁺06] T. Colomb, J. Kuhn, F. Charriere, C. Depeursinge, P. Marquet, and N. Aspert. Total aberrations compensation in digital holographic microscopy with a reference conjugated hologram. *Optics Express*, 14(10): 4300–4306, 2006.
- [CMD99] Etienne Cuche, Pierre Marquet, and Christian Depeursinge. Simultaneous Amplitude-Contrast and Quantitative Phase-Contrast Microscopy by Numerical Reconstruction of Fresnel Off-Axis Holograms. *Applied Optics*, 38(34), 1999.
- [CMD00] E. Cuche, P. Marquet, and C. Depeursinge. Spatial filtering for zero-order and twin-image elimination in digital off-axis holography. *Applied Optics*, 39(23): 4070–4075, 2000.
- [CMK⁺06] T. Colomb, F. Montfort, J. Kühn, N. Aspert, Etienne Cuche, A. Marian, F. Charrière, S. Bourquin, Pierre Marquet, and Chris-

- tian D. Depeursinge. Numerical Parametric Lens for Shifting Magnification, and Complete Aberration Compensation in Digital Holographic Microscopy. *J. Opt. Soc. Am. A*, 23(12), 2006.
- [CMM⁺06] F. Charrière, A. Marian, F. Monfort, J. Kuehn, T. Colomb, E. Cuche, P. Marquet, and C. Depeursinge. Cell refractive index tomography by digital holographic microscopy. *Optics Letters*, 31(2): 178–180, 2006.
- [Col06] Tristan Colomb. *Numerical Aberrations Compensation and Polarization Imaging in Digital Holographic Microscopy*. PhD thesis, Ecole Polytechnique Federale de Lausanne, Suisse, 2006.
- [CP76] D. Casasent and D. Psaltis. Scale invariant optical correlation using mellin transforms. *Optics Communications*, 17(1): 59–63, 1976.
- [CPC⁺06] F. Charrière, N. Pavillon, T. Colomb, C. Depeursinge, T.J. Heger, E.A.D. Mitchell, P. Marquet, and B. Rappaz. Living specimen tomography by digital holographic microscopy: morphometry of testate amoeba. *Optics Express*, 14(16): 7005 – 7013, 2006.
- [CW84] Y-Y. Cheng and J.C. Wyant. Two-wavelength phase shifting interferometry. *Applied Optics*, 23(24): 4539–4543, 1984.
- [CW85] Y-Y. Cheng and J.C. Wyant. Multiple-wavelength phase-shifting interferometry. *Applied Optics*, 24(6): 804–807, 1985.
- [CWW⁺11] H. Cui, D. Wang, Y. Wang, J. Zhao, and Y. Zhang. Phase aberration compensation by spectrum centering in digital holographic microscopy. *Optics Communications*, 284(18): 4152–4155, 2011.
- [DG01] Stéphane Derrode and Faouzi Ghorbel. Robust and Efficient Fourier-Mellin Transform Approximations for Gray-Level Image Reconstruction and Complete Invariant Description. *Computer Vision and Image Understanding*, 83(1): 57–78, 2001.
- [DJ07] M. Daneshpanah and B. Javidi. Tracking biological microorganisms in sequence of 3d holographic microscopy images. *Optics Express*, 15(17): 10761–10766, 2007.
- [DZS⁺09a] J. Di, J. Zhao, W. Sun, H. Jiang, and X. Yan. Phase aberration compensation of digital holographic microscopy based on least squares surface fitting. *Optics Communications*, 282(19): 3873–3877, 2009.
- [DZS⁺09b] J. Di, J. Zhao, W. Sun, H. Jiang, and X. Yan. Phase Aberration Compensation of Digital Holographic Microscopy Based on Least Squares Surface Fitting. *Optics Communications*, (282): 3873–3877, 2009.

-
- [Edl79] L. Edler. Phytoplankton and Chlorophyll Recommendations on Methods for Marine Biological Studies in the Baltic Sea. *Baltic Marine Biologist Publication*, (5): 384, 1979.
 - [FDNF⁺03] P. Ferraro, S. De Nicola, A. Finizio, G. Coppola, S. Grilli, C. Magro, and G. Pierattini. Compensation of the inherent wave front curvature in digital holographic coherent microscopy for quantitative phase-contrast imaging. *Applied Optics*, 42(11): 1938–1946, 2003.
 - [FSC04] M. G. Forero, F. Sroubek, and G. Cristobal. Identification of tuberculosis bacteria based on shape and color. *Real-Time Imaging*, 10(4): 251–262, 2004.
 - [Gab48] D. Gabor. A new microscopic principle. *Nature*, 161(4098): 777–778, 1948.
 - [Gab51] D. Gabor. Microscopy by reconstructed wave fronts: li. *Proceedings of the Physical Society. Section B*, 64(6): 449–469, 1951.
 - [GDK03] J. Gass, A. Dakoff, and M. K. Kim. Phase imaging without 2pi ambiguity by multiwavelength digital holography. *Optics Letters*, 28(13): 1141–1143, 2003.
 - [GFDN⁺01] S. Grilli, P. Ferraro, S. De Nicola, A. Finizio, G. Pierattini, and R. Meucci. Whole optical wavefields reconstruction by digital holography. *Optics Express*, 9(6): 294–302, 2001.
 - [GL67] J. W Goodman and W. Lawrence. Digital Image Formation from Electronically Detected Holograms. *Appl. Phys. Lett.*, (11): 77–79, 1967.
 - [Goo68] J. Goodman. *Introduction to Fourier Optics*. McGraw-Hill book company, 1968.
 - [GR94] Dennis C. Ghiglia and Louis A. Romero. Robust two-dimensional weighted and unweighted phase unwrapping that uses fast transforms and iterative methods. *Journal of the Optical Society of America A: Optics and Image Science, and Vision*, 11(1): 107–117, 1994.
 - [GSOD03] R. E. Green, H. M. Sosik, R. J. Olson, and M. D. DuRand. Flow cytometric determination of size and complex refractive index for marine particles: Comparison with independent and bulk estimates. *Applied Optics*, 42(3): 526–541, 2003.
 - [Har78] F.G. Harris. On the use of windows for harmonic analysis with the discrete fourier transform. *Proceedings of the IEEE*, 66(1): 51–83, 1978.
 - [Hec87] E. Hecth. *Optics*. Addison Wesley Publishing Company, 2^âa edition, 1987.

- [HMGC07] Jorge Herrera, Emigdio Mendoza, Claudia García, and Román Castañeda. Aplicación de la microscopía holográfica digital en transmisión para caracterización del espesor de recubrimientos delgados. 2007.
- [HRK⁺99] H. Hillebrand, C-D. Rürselen, D. Kirschtel, U. Pollinger, and T. Zohary. Biovolume Calculation for Pelagic and Benthic Microalgae. *Journal of Phycology*, 35(2): 403–424, 1999.
- [JST01] Maxime Jacquot, Patrick Sandoz, and Gilbert Tribillon. High Resolution Digital Holography. *Optics Communications*, (190): 87–94, 2001.
- [JT00] B. Javidi and E. Tajahuerce. Three-dimensional object recognition by use of digital holography. *Optics Letters*, 25(9): 610–612, 2000.
- [KCK⁺04] B. Kemper, D. Carl, S. Knoche, R. Thien, and G. Von Bally. Holographic interferometric microscopy systems for the application on biological samples. In *Proceedings of SPIE - The International Society for Optical Engineering*, volume 5457, pages 581–588, 2004.
- [Kim00] M.K. Kim. Tomographic three-dimensional imaging of a biological specimen using wavelength-scanning digital interference holography. *Optics Express*, 7(9): 305–310, 2000.
- [KKL08] A. Khamaladze, M. K. Kim, and Chun-Min Lo. Phase Imaging of Cells by Simultaneous Dualwavelength Reflection Digital Holography. *OPTICS EXPRESS*, 16(15), 2008.
- [KL66] P. E. Kovala and J. P. Larrance. Computation of Phytoplankton Cell Numbers, Cell Volume, Cell Surface Area, and Plasma Volume per Litre From Microscopical Counts. *Special Report*, 38: 1–91, 1966.
- [KMY72] M. A. Kronrod, N. S. Merzlyakov, and L. P. Yaroslavskii. Reconstruction of a Hologram with a Computer. *Sov. Phys. Tech. Phys.*, (17): 333–334, 1972.
- [KMZ⁺] A. Khmaladze, R.L. Matz, C. Zhang, J. Jasensky, M.M. Banaszak Holl, and Z. Chen. Dual wavelength digital holography phase unwrapping by linear regression. In *Proceedings of SPIE 8043, Three-Dimensional Imaging, Visualization, and Display*, May.
- [KMZ⁺11] A. Khmaladze, R.L. Matz, C. Zhang, T. Wang, M.M. Banaszak Holl, and Z. Chen. Dual-wavelength linear regression phase unwrapping in three-dimensional microscopic images of cancer cells. *Optics Letters*, 36(6): 912–914, 2011.

- [KS11] B. I. Konoplya and F. S. Soares. New geometric models for calculation of microalgal biovolume. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 54(3): 527–534, 2011.
- [LÁB09] J.R. Lerma and J. Álvarez-Borrego. Reconocimiento de caracteres basado en firmas vectoriales. *e-Gnosis*, 9: 1–7, 2009.
- [LARFR00] F.J. Lopez-Antunano, H. Rangel-Flores, and C. Ramos. Diagnosis of chagas disease. *Revista Latinoamericana de Microbiología*, 42: 121 – 129, 2000.
- [LBU04] M. Liebling, T. Blu, and M. Unser. Complex-wave retrieval from a single off-axis hologram. *Journal of the Optical Society of America A: Optics and Image Science, and Vision*, 21(3): 367–377, 2004.
- [LCC] C-K. Liang, L-W. Chang, and H.H. Chen. Analysis and compensation of rolling shutter effect. In *IEEE Transactions on Image Processing*, 2008.
- [Lei97] E.N. Leith. Overview of the developments of holography. *Journal of imaging science and technology*, 41(3): 201–204, 1997.
- [Lie04] M. Liebling. *On Fresnelets, Interference Fringes and Digital Holography*. PhD thesis, 2004.
- [IMP00] John Graham le Maistre Pratt. Application of the Fourier-Mellin transform to traslation, rotation and scale invariant plant leaf identification. Master’s thesis, 2000.
- [LO66] R. F. Van Ligten and H. Osterberg. Holographic Microscopy. *Nature*, 211: 282–283, 1966.
- [Loh65] A.W. Lohmann. Reconstruction of vectorial wavefronts. *Applied Optics*, 4(12): 1667–1668, 1965.
- [LPC] C-K. Liang, Y-C. Peng, and H.H. Chen. Rolling shutter distortion correction. In *Proceedings of SPIE 5960, Communications and Image Processing 2005*.
- [LS82] E.N. Leith and G.J. Swanson. Holographic aberration compensation with partially coherent light. *Optics Letters*, 7(12): 596–598, 1982.
- [LU62] E.N. Leith and J. Upatnieks. Reconstructed wavefronts and communication theory. *Journal of the Optical Society of America*, 52(10): 1123–1128, 1962.
- [LU63] E.N. Leith and J. Upatnieks. Wavefront reconstruction with continuous-tone objects. *Journal of the Optical Society of America*, 53(12): 1377–1381, 1963.

- [LU64] E.N. Leith and J. Upatnieks. Wavefront reconstruction with diffrused illumination and three-dimensional objects. *Journal of the Optical Society of America*, 54(11): 1295–1301, 1964.
- [LU04] M. Leibling and Michael Unser. Autofocus for Digital Fresnel Holograms by Use of a Fresnelet-Sparsity Criterion. *J. Opt. Soc. Am. A*, 21(12), 2004.
- [Lug64] A.V. Lugt. Signal detection by complex spatial filtering. *IEEE Transactions on Information Theory*, 10(2): 139–145, 1964.
- [MAG⁺07] L. Miccio, D. Alfieri, S. Grilli, P. Ferraro, A. Finizio, L. De Petrocellis, and S.D. Nicola. Direct full compensation of the aberrations in quantitative phase microscopy of thin objects by a single digital hologram. *Applied Physics Letters*, 90: 041104, 2007.
- [MDCC05] M.E. Mac Donagh, M.A. Casco, and M.C. Claps. Colonization of a neotropical reservoir (córdoba, argentina) by ceratium hirundinella (o.f. muller) bergh. *Annales de Limnologie - International Journal of Limnology*, 41: 291–299, 2005.
- [MDCD⁺11] P. Memmolo, G. Di Caprio, C. Distanto, M. Paturzo, R. Puglisi, D. Balduzzi, A. Galli, G. Coppola, and P. Ferraro. Identification of bovine sperm head for morphometry analysis in quantitative phase-contrast holographic microscopy. *Optics Express*, 19(23): 23215–23226, 2011.
- [MJ05] I. Moon and B. Javidi. Shape tolerant three-dimensional recognition of biological microorganisms using digital holography. *Optics Express*, 13(23): 9612–9622, 2005.
- [MMM⁺13] F. Merola, L. Miccio, P. Memmolo, G. Di Caprio, A. Galli, R. Puglisi, D. Balduzzi, G. Coppola, P. Netti, and P. Ferraro. Digital holography as a method for 3d imaging and estimating the biovolume of motile cells. *Lab on a Chip*, 13: 4512–4516, 2013.
- [MPABGE06] R. R. Mourino-Perez, J. Alvarez-Borrego, and C. Gallardo-Escarate. Digital color correlation for the recognition of vibrio cholerae 01 in laboratory and environmental samples. *Revista de Biología Marina y Oceanografía*, 41(1): 77–86, 2006.
- [MRM⁺05] P. Marquet, B. Rappaz, P. J. Magistretti, E. Cuche, Y. Emery, T. Colomb, and C. Depeursinge. Digital holographic microscopy: A noninvasive contrast imaging technique allowing quantitative visualization of living cells with subwavelength axial accuracy. *Optics Letters*, 30(5): 468–470, 2005.
- [MYK06] Cristopher J. Mann, Lingfenn Yu, and M. Kim. Movies of Cellular and Sub-Cellular Motion by Digital Holographic Microscopy. *BioMedical Engineering Online*, 5(21), 2006.

- [MYLK05] Cristopher J. Mann, Lingfenn Yu, Chun-Min Lo, and Pyung K. Kim. High Resolution Quantitative Phase-Contrast Microscopy by Digital Holography. *OPTICS EXPRESS*, 13(22), 2005.
- [NM65] J. A. Nelder and R. Mead. A Simplex Method for Function Minimization. *Computer Journal*, 7: 308–313, 1965, <http://bit.ly/13yB1X5>.
- [Ots79] N. Otsu. A threshold selection method from gray level histograms. *IEEE Transactions on Systems, Man and Cybernetics*, 9(1): 62–66, 1979.
- [PG98] Mark D. Pritt and Dennis C. Ghiglia. Two-Dimensional Phase Unwrapping, theory algorithtms and software. 1998.
- [PPÁBCM03] J.L. Pech-Pacheco, J. Álvarez-Borrego, G. Cristóbal, and S.K. Matthias. Automatic object identification irrespective to geometric changes. *Optical Engineering*, 42(2): 551–559, 2003.
- [PPCÁBC01] J. L. Pech-Pacheco, Gabriel Cristóbal, Josué Álvarez-Borrego, and León Cohen. Automatic System for Phytoplanktonic Algae Identification. *Limnetica*, 20(1): 143–158, 2001.
- [PPL⁺08] G. Popescui, Y. Parki, N. Lue, C. Best-Popescu, L. Deflores, R.R. Dasari, M.S. Feld, and K. Badizadegan. Optical imaging of cell mass and growth dynamics. *American Journal of Physiology Cell Physiology*, 295(2): C538–C544, 2008.
- [PRP⁺05] F. Palacios, J. Ricardo, D. Palacios, E. Gonçalves, J. Valin, and R. De Souza. 3D Image Reconstruction of Transparent Microscopic Objects Using Digital Holography. *Optics Comunications*, 248: 41–50, 2005.
- [RAR00] G.G. Romero, E.E. Alanis, and H. Rabal. Statistic of the dynamics speckle produced by a rotating diffuser and its application to the assessment of paint drying. *Optical Engineering*, 39(6): 1652–1658, 2000.
- [Rey84] C. S. Reynolds. *The Ecology of Freshwater Phytoplankton*. Cambridge University Press, 1984.
- [RLG⁺90] P. C. Reid, C. Lancelot, W. W. C. Gieskes, E. Hagmeier, and G. Weichart. Phytoplankton of the north sea and its dynamics: A review. *Netherlands Journal of Sea Research*, 26(2-4): 295–331, 1990.
- [RMC⁺05] B. Rappaz, P. Marquet, E. Cuhe, Y. Emery, C. Depeursinge, and P. J. Magistretti. Measurement of the integral refractive index and dynamic cell morphometry of living cells with digital holographic microscopy. *Optics Express*, 13(23): 9361–9373, 2005.

- [RR87] C. Rodier and F. Rodier. Interferogram Analysis Using Fourier Transform Techniques. *Applied Optics*, 26: 1668–1673, 1987.
- [Sch94] Ulf Schnars. Direct Phase Determination in Hologram Interferometry with use of Digitally Recorded Holograms. *J. Opt. Soc. Am. A*, 11: 2011–2015, 1994.
- [SJ05] Ulf Schnars and Werner Jueptner. *Digital Holography*. Springer, 2005.
- [SL03] Jun Sun and Dongyan Liu. Geometric Models for Calculating Cell Biovolume and Surface Area for Phytoplankton. *Journal of Plankton Research*, 25(11): 1331–1346, 2003.
- [Sma70] T. J. Smayda. The Suspension and Sinking of Phytoplankton in the Sea. *Oceanogr. Mar. Biol. Ann. Rev.*, 83: 353–414, 1970.
- [Sma78] T. J. Smayda. From Phytoplankton to Biomass. *Sornia Graphic Methodology*, pages 273–279, 1978.
- [SMS⁺09] M.J Silverio, E. Montañez, G. anf Fra, M. Saracho, S Amaya, and B. Traccanna. Variación poblacional de ceratium hirundinella (dinophyceae) en embalses eutróficos de catamarca (argentina) y su relación con parámetros ambientales. *Huayllu-Bios*, 3: 13–31, 2009.
- [SW05] Ulf Schnars and Jüeptner W. Digital Holography: Digital Hologram Recording, Numerial Reconstruction and Related Techniques. In *Verlang Berlin Heidelberg*, pages 56–57. Springer, 2005.
- [TK08] Sergios Theodoridis and Konstantinos Koutroumbas. Pattern Recognition. *IEEE Transactions on Neural Networks*, 19(2): 376, 2008.
- [ULL66] J. Upatnieks, A.V. Lugt, and E.N. Leith. Correction of lens aberrations by means of holograms. *Applied Optics*, 5(4): 589–593, 1966.
- [VCB07] M. R. Vadrucci, M. Cabrini, and A. Basset. Biovolume determination of phytoplankton guilds in transitional water ecosystems of mediterranean ecoregion. *Transitional Waters Bulletin*, 1(2): 83–102, 2007.
- [VL98] G.N. Vishnyakov and G.G. Levin. Optical microtomography of phase objects. *Optics and Spectroscopy*, 85(1): 73–77, 1998.
- [VMF13] M. R. Vadrucci, C. Mazziotti, and A. Fiocca. Cell biovolume and surface area in phytoplankton of mediterranean transitional water ecosystems: Methodological aspects. *Transitional Waters Bulletin*, 7(2): 100–123, 2013.

- [VO66] R.F. Vanligte and H. Osterberg. Holographic microscopy. *Nature*, 211: 282–283, 1966.
- [VRT⁺92] Peter G. Verity, Charles Y. Robertson, Craig R. Tronzo, Melinda G. Andrews, James R. Nelson, and Michael E. Sieracki. Relationships Between Cell Volume and the Carbon and Nitrogen Content of Marine Photosynthetic Nanoplankton. *Limnology and Oceanography*, 37(7): 1434–1446, November 1992, <http://www.jstor.org/stable/2837961>.
- [YK05] L. Yu and M.K. Kim. Wavelength-scanning digital interference holography for tomographic three-dimensional imaging by use of the angular spectrum method. *Optics Letters*, 30(16): 2092–2094, 2005.
- [ZBCRR14] N. Zaburlin, A. Boltovskoy, C. Costigliolo Rojas, and R.M. Rodriguez. Primer registro del dinoflagelado invasor *ceratium furcoides* (levander) langhans 1925 en la argentina y su distribución en el área de influencia del embalse yaciretá (río paraná, argentina paraguay). *Limnetica*, 33(1): 153–160, 2014.
- [Zer42a] F. Zernike. Phase contrast, a new method for the microscopic observation of transparent objects. *Physica*, 9(7): 686–98, 1942.
- [Zer42b] F. Zernike. Phase contrast, a new method for the microscopic observation of transparent objects part ii. *Physica*, 9(10): 674–86, 1942.
- [ZPI93] B. Zheng, C.M. Pleass, and C.S. Ih. Real-time characterization of motion of motile microorganisms by means of a hybrid laser doppler velocimeter technique. *Optical Engineering*, 32(11): 2966–2973, 1993.